

**Defizienzen in der Interaktion von Makrophagen und T-Lymphozyten
bei der Entstehung des Morbus Whipple**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Kathleen Sara Weigt, M. Sc.

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Dr. Thomas Schneider
2. Prof. Dr. Thomas F. Meyer
3. Prof. Dr. Emanuel Heitlinger

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2020

DEN WISSENSCHAFTLERN GEHT ES WIE DEN CHAOTEN.

ES IST ALLES DA, MAN MUSS ES NUR SUCHEN.

- FRANZ KERN -

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 <i>Tropheryma whipplei</i> und die Pathogenese des Morbus Whipple	1
1.2 Grundlagen für das Verständnis der Interaktion von Erregern und der zellulären Immunantwort.....	3
1.3 Immunantworten beim Morbus Whipple	7
1.4 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik des Morbus Whipple	7
1.5 Fragestellung und Zielsetzung	9
2 Material und Methoden	12
2.1 Technische Geräte	12
2.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.3 Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	14
2.3.1 Chemikalien.....	14
2.3.2 Puffer, Medien und Lösungen.....	14
2.3.3 Kommerzielle Testsysteme (Kits) und Enzyme	15
2.3.4 Oligonukleotide.....	16
2.3.5 Vektoren.....	16
2.3.6 Zellstimulanzen	17
2.3.7 Antikörper	18
2.4 Patientenmaterial.....	19
2.5 Software.....	21
2.6 Mikrobiologische Methoden	21
2.6.1 Anzucht von <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	21
2.6.2 Kultivierung von <i>T. whipplei</i> Bakterien.....	22
2.6.3 Konservierung von <i>T. whipplei</i> Bakterien.....	22
2.6.4 Herstellung von <i>T. whipplei</i> Lysat.....	22
2.6.5 Optische Dichtebestimmung	22
2.7 Zellbiologische Methoden	22
2.7.1 Zellkulturbedingungen	22
2.7.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	22
2.7.3 Konservierung und Reaktivierung humaner Zellen	23

2.7.4	Vollblutstimulation.....	23
2.7.5	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	23
2.7.6	Stimulationsversuche mit PBMC.....	24
2.7.7	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mittels Elektroporation	24
2.7.8	Analyse der T-Lymphozyten-Reaktivität gegen transfizierte PBMC	25
2.7.9	Magnetische Isolation von CD14 ⁺ Monozyten.....	26
2.7.10	Reinheitsbestimmung isolierter Monozyten	26
2.7.11	Infektion von CD14 ⁺ Monozyten in Suspension.....	26
2.7.12	Generierung <i>in vitro</i> differenzierter Mφ.....	26
2.7.13	Ablösung <i>in vitro</i> differenzierter Mφ.....	26
2.7.14	Beeinflussung der intrazellulären <i>T. whipplei</i> Replikation durch Zytokine	27
2.7.15	Einfluss von <i>T. whipplei</i> auf den Phänotyp <i>in vitro</i> differenzierter Mφ	27
2.8	Analytische Durchflusszytometrie	27
2.8.1	Färbung von Oberflächenantigenen	28
2.8.2	Fixierung von Zellen	29
2.8.3	Färbung intrazellulärer Proteine.....	29
2.9	Molekularbiologische Methoden	29
2.9.1	Nukleinsäure-Extraktionen	29
2.9.2	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	29
2.9.3	Reverse Transkription	30
2.9.4	<i>Real-time</i> PCR.....	30
2.10	Mikroarray basierte Transkriptomanalyse	31
2.10.1	Überprüfung der RNA-Integrität.....	32
2.10.2	Amplifikation und Labeling	32
2.10.3	Hybridisierung und Scannen des Mikroarrays	32
2.10.4	Mikroarray Analyse	32
2.11	Zytokinquantifizierung mittels LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit.....	33
2.12	Histologische Methoden.....	33
2.12.1	Fixierung, Paraffineinbettung und Antigendemaskierung von Geweben	33
2.12.2	Immunhistochemische Färbungen	34
2.13	Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Untersuchungen zur T-Lymphozyten-Reaktivität nach Stimulation mit <i>T. whipplei</i> Proteinen	36
3.2	Untersuchungen zur Interaktion von <i>T. whipplei</i> Bakterien mit humanen Mφ.....	40
3.2.1	<i>In vitro</i> Polarisation von Mφ	40

3.2.2	Beeinflussung des Mφ-Phänotyps durch <i>T. whipplei</i> und bakterielle Bestandteile	42
3.2.3	Einfluss von <i>T. whipplei</i> und <i>M. bovis</i> BCG auf das Zytokinprofil von Mφ	46
3.3	Transkriptomanalyse <i>in vitro</i> differenzierter Mφ und <i>T. whipplei</i> induzierte Änderungen der Genexpression.....	47
3.3.1	Etablierung produktiver und protektiver Bedingungen einer <i>T. whipplei</i> Infektion	47
3.3.2	Einfluss von IL-10 und TNF-α auf die extrazelluläre <i>T. whipplei</i> Replikation	49
3.3.3	RNA-Qualitätskontrolle und Datennormalisierung.....	50
3.3.4	Vergleich des Mφ-Transkriptoms von MW-Patienten und gesunden Kontrollen	51
3.3.5	Einfluss von <i>T. whipplei</i> auf die Genexpression der Mφ	53
3.3.6	Analyse übereinstimmender IDs der Vergleiche 1-4 und 5-8.....	55
3.3.7	Funktionelle Annotation differenziell exprimierter Gene	58
3.3.8	Analyse der Genexpression von IRF4	58
3.4	Analyse der systemischen <i>T. whipplei</i> Verbreitung durch Monozyten	59
3.4.1	Bestätigung einer chronischen <i>T. whipplei</i> Infektion durch die standardisierte Diagnostik aus duodenalen Biopsien	59
3.4.2	Nachweis von <i>T. whipplei</i> Bakterien in Fraktionen des peripheren Blutes.....	61
4	Diskussion	66
4.1	Ausgangsfragestellung.....	66
4.2	Untersuchungen zur verminderten T-Lymphozyten-Reaktivität von MW-Patienten.....	66
4.3	Analyse der Immunmodulation durch <i>T. whipplei</i>	69
4.3.1	Charakterisierung <i>in vitro</i> differenzierter Mφ und Analyse des Phänotyps.....	69
4.3.2	Etablierung produktiver und protektiver Infektionsbedingungen	71
4.3.3	Analyse der differenziellen Genexpression	71
4.4	Prospektive Pilotstudie zur Analyse der systemischen <i>T. whipplei</i> Verbreitung.....	73
	Literaturverzeichnis	V
	Abbildungsverzeichnis	XX
	Tabellenverzeichnis	XXI
	Anhangsverzeichnis.....	XXII
	Anhang	XXIII
	Veröffentlichungen	XXXIX
	Eidesstattliche Erklärung	XL

Zusammenfassung

Morbus Whipple (MW) ist eine chronische multisystemische Infektionskrankheit, die durch das ubiquitär vorkommende Bakterium *Tropheryma whipplei* (*T. whipplei*) verursacht wird. Während asymptomatische Trägerschaften und selbst-limitierende Infektionen mit *T. whipplei* häufig vorkommen, ist die chronische Manifestation äußerst selten. Die geringe Inzidenz des MW bei gleichzeitiger Häufung in Familienanamnesen und die Assoziationen mit Genvarianten, die sowohl die Antigenpräsentation als auch die T-Lymphozyten-Funktion modulieren, deuten auf eine Assoziation mit prädisponierenden Faktoren bei der Entstehung der Erkrankung hin. Die duodenale Mukosa von MW-Patienten ist massiv durch *Periodic acid-Schiff* (PAS)⁺ alternativ aktivierte Makrophagen (Mφ) infiltriert, aber *T. whipplei*-spezifische CD4⁺ T-Helferzelle Typ 1 (Th1) Antworten fehlen.

Unklar war, ob eine Beeinträchtigung der Antigenpräsentation oder eine mangelnde Erkennung der Antigene seitens der T-Lymphozyten die verminderte Th1-Antwort bedingt. Es war nicht bekannt, ob alternativ aktivierte Mφ für eine *T. whipplei*-Infektion empfänglicher sind oder ob der Erreger selbst die alternative Aktivierung in prädispositionierten Patienten induziert. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, die T-Lymphozyten-Reaktivität auf die Antigenpräsentation *in vitro* zu analysieren um die Interaktion von *T. whipplei* mit peripheren monozytären Zellen besser zu verstehen.

CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten immunkompetenter Kontrollpersonen zeigten adäquate Reaktionen auf Bakterienlysate sowie auf Hsp70 und GrpE von *T. whipplei*, die als rekombinante Proteine eingesetzt wurden. MW-Patienten induzierten keine pro-inflammatorische Immunantwort auf diese Stimuli. Bei produktiver Präsentation des GrpE Antigens von *T. whipplei* über den HLA-ABC (MHC-Klasse-I)-Komplex durch allogene PBMC wurde in MW-Patienten ein vermehrter Anteil Perforin⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten detektiert. Damit wurde erstmalig gezeigt, dass die verminderte T-Lymphozyten-Reaktion in MW-Patienten nicht auf einen T-Lymphozyten-Defekt, sondern auf eine Dysfunktion im Zuge der Antigenpräsentation oder Kostimulation zurückzuführen ist. Phänotypische Analysen wiesen eine Reduktion der HLA-DR und CCL-18 Expression in *in vitro* infizierten Mφ von MW-Patienten und Kontrollpersonen nach. Stimulationen mit bakteriellem Lysat und zellfreiem Bakterienüberstand induzierten keine phänotypischen Änderungen, womit eine aktive Modulation durch *T. whipplei* nachgewiesen wurde. Das Transkriptom der Mφ von MW-Patienten und Kontrollpersonen unterschied sich in der Expression von 105 Genen, die als Kandidatengene für die Manifestation der Erkrankung identifiziert werden konnten. In einer prospektiven Pilotstudie mit 20 MW-Patienten wurde eine *rpoB*-spezifische Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von *T. whipplei* DNA in Fraktionen des peripheren Blutes genutzt. Die Nachweismethode wies eine Sensitivität von bis zu 80 % und einen positiven Vorhersagewert von 100 % auf. Der positive Nachweis des Erregers in CD14⁺ depletierten Zellen zeigte erstmals, dass neben Monozyten weitere Wirtszellen in die systemische Verbreitung von *T. whipplei* involviert sind. Diese nicht-invasive Detektionsmethode ist geeignet, die MW-Diagnostik vor allem von MW-Patienten ohne gastrointestinale Beteiligung zu begleiten.

Zusammenfassend unterstreichen die hier vorgelegten Ergebnisse, dass prädisponierende Faktoren die Infektion suszeptibler Individuen mit *T. whipplei* begünstigen. Nach produktiver Infektion unterstützt der lebende Erreger seine systemische Verbreitung durch aktive Immunmodulation. Diese Befunde tragen zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie von *T. whipplei*-Infektionen bei und liefern neue Einblicke in das komplexe Netz der Wechselwirkungen zwischen T-Lymphozyten, Mφ und den Erregern.

Abstract

Whipple's disease (WD) is a chronic multisystemic infection with the ubiquitous bacterium *Tropheryma whippelii* (*T. whippelii*). Whereas self-limiting infections with *T. whippelii* occur frequently and lead to a protective immunity, chronic manifestation of WD is rare and seems to be associated with predisposing immunological factors. An accumulation of WD-patients in family anamnesis is described, as well as an association with gene variants that modulate both the antigen presentation and the T cell function. The duodenal mucosa of WD patients is massively infiltrated by periodic acid Schiff (PAS)⁺ alternatively activated macrophages (M ϕ), but a *T. whippelii*-specific CD4⁺ T helper cell (Th) type 1 response is missing. However, it is unclear whether the reduced Th1 response in WD-patients is caused by an impairment of antigen presentation or the diminished ability of antigen recognition by T cells. Furthermore, it is unknown whether alternatively activated M ϕ are more susceptible to *T. whippelii* infection or the pathogen itself induces the alternative activation in predisposed patients.

To gain further knowledge, the present work analysed the T cell reactivity against *T. whippelii* antigens and the interaction of the pathogen with peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. Upon stimulation with bacterial lysate, recombinant GrpE or Hsp70 of *T. whippelii*, the proportions of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells were significantly lower in WD-patients as compared to healthy controls. The productive presentation of GrpE antigens via the HLA-ABC (MHC class I) complex resulted in an increase of perforin⁺ CD8⁺ T cells in WD-patients. The proportion of interferon-gamma⁺ CD8⁺ T cells was comparable to healthy controls, thus demonstrating for the first time that the reduced T cell response in WD-patients is not due to a T cell defect, but due to a dysfunction in antigen presentation or costimulation. Phenotypic analysis revealed a significant reduction of HLA-DR and CD18 expression of *in vitro* differentiated M ϕ infected with vital *T. whippelii*. Bacterial lysate and bacterial supernatant did not induce phenotypic changes, supporting the hypothesis of an active immunomodulation by *T. whippelii* that mediates reduced antigen presentation and enables intracellular persistence. Microarray based transcriptome analyses of M ϕ from WD-patients and healthy controls identified 105 candidate genes that may be related to the chronic manifestation of the disease. The clinical relevance of these genes has to be examined in further studies, as well as the importance of CD14⁺ depleted cells for the pathogenesis of WD. A prospective pilot study with 20 WD-patients was performed to detect *T. whippelii* DNA in fractions of the peripheral blood via *rpoB*-specific polymerase chain reaction. The detection method showed a sensitivity of up to 80 % and a positive predictive value of 100 %. The detection of *T. whippelii* DNA in CD14⁺ depleted cells indicated for the first time that, in addition to monocytes, further host cells are involved in the systemic distribution of *T. whippelii*. This non-invasive *rpoB*-specific polymerase chain reaction is suitable for supporting the diagnosis of WD, especially in patients without gastrointestinal involvement.

The results confirmed the importance of predisposing factors for chronic manifestation of WD. After productive infection, *T. whippelii* supports its systemic spread through active immunomodulation. These findings contribute to a better understanding of the pathophysiology of *T. whippelii* infections and provide new insights into the complex network of interactions between T cells, M ϕ and the pathogen.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
-	Negativ
+	Positiv
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CCL	CC-Chemokine Ligand
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>)
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T cells</i>)
DC	Dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ec GrpE	GrpE Protein von <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
<i>et al.</i>	Und andere (<i>et alii</i> , Latein)
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
high	Starke Expression
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPCDA	<i>High Performance Chip Data Analysis</i>
Hsp	Hitzeschockprotein (<i>Heat shock protein</i>)
ID	Identifikationsnummer
IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatorischer Faktor
kb	Kilobasen
low	Schwache Expression

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
LPS	(Bakterielles) Lipopolysaccharid
<i>M. bovis</i> BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> Bacillus Calmette-Guérin, attenuierter Impfstoff
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M1pBCG	<i>M. bovis</i> BCG infizierte M1 Makrophagen
M1pTW	<i>T. whipplei</i> infizierte M1 Makrophagen
M2pBCG	<i>M. bovis</i> BCG infizierte M2 Makrophagen
M2pTW	<i>T. whipplei</i> infizierte M2 Makrophagen
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MT GrpE	GrpE Protein von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MW	Morbus Whipple
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
Mφ	Makrophagen
Mφ1	Klassisch aktivierte M1 Makrophagen
Mφ2	Alternativ aktivierte M2 Makrophagen
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NPW	Negativer prädiktiver Wert
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAMP	Pathogenassoziierte Muster (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PAS	Perjodsäure-Schiffsches Reagenz (<i>periodic acid-Schiff</i>)
PBMC	Mononukleäre Blutzelle (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
pECGrpE	pGUH Vektor mit GrpE aus <i>E. coli</i>
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
PFA	Paraformaldehyd
pMTGrpE	pGUH Vektor mit GrpE aus <i>M. tuberculosis</i>
PPW	Positiver prädiktiver Wert
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
pTWGrpE	pGUH Vektor mit GrpE aus <i>T. whipplei</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
RIN	RNA-Integritätswert (<i>RNA integrity number</i>)
rpm	Rundenumdrehungen (<i>rounds per minute</i>)
<i>rpoB</i>	Beta (β)-Einheit der RNA-Polymerase
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	Echtzeit-PCR (<i>Real-time PCR</i>)
SEB	Staphylokokken Enterotoxin-B
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
<i>T. whipplei</i>	<i>Tropheryma whipplei</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	T-Helferzelle, z.B. Th1 (pro-inflammatorisch) und Th2 (anti-inflammatorisch)
TLR	<i>Toll like</i> -Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Lymphozyten
TW GrpE	GrpE Protein von <i>T. whipplei</i>
TzR	T-Lymphozyten Rezeptor, T-Zell-Rezeptor
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 *Tropheryma whipplei* und die Pathogenese des Morbus Whipple

Die Erstbeschreibung des Morbus Whipple (MW) erfolgte im Jahr 1907 durch den Pathologen George Hoyt Whipple. Er beschrieb Fettablagerungen in der Darmmukosa sowie den mesenterialen Lymphknoten und vermutete bereits zum damaligen Zeitpunkt eine Infektionskrankheit als Ursache für die von ihm beschriebene „intestinale Lipodystrophie“ [1]. Der Nachweis von Makrophagen (Mφ) mit zytoplasmatischen *Periodic acid-Schiff* (PAS)⁺ Inklusionen im Jahr 1949 [2] und die elektronenmikroskopische Visualisierung intrazellulärer Bakterien in den 1960er Jahren bekräftigte diese Hypothese [3-5]. Die erfolgreiche Sequenzierung der 16S ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNA) der Bakterien im Jahr 1991 führte zur Identifizierung von „*Tropheryma whipplei*“ als krankheitsauslösendes Pathogen [6, 7]. Nach erfolgreicher Kultivierung und Charakterisierung erfolgte im Jahr 2001 die Umbenennung des Pathogens in „*Tropheryma whipplei*“ (*T. whipplei*) [8-10]. Seither gilt als bewiesen, dass die Entstehung des MW auf eine Infektion mit *T. whipplei* zurückzuführen ist [11], obwohl ein Krankheitsmodell als finaler Beweis fehlt.

Bei dem Erreger handelt es sich um ein 0,2 x 2 µm großes, stäbchenförmiges Bakterium [12], das zu der Klasse der Gram⁺ Aktinobakterien gehört [13]. Die Sequenzanalyse der 16S-23S rRNA ergab die taxonomische Einordnung zwischen den Familien der *Actinomycetaceae* und *Cellulomonadaceae* [7, 14]. Der hohe Guanin-Cytosin Gehalt von 46,3 % lässt auf eine parasitische Lebensweise des Pathogens schließen [9, 10, 13]. Zudem deuten das reduzierte Genom von *T. whipplei* (925 kb), das Fehlen essenzieller Energiestoffwechsel- und Biosynthesewege sowie der zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Redoxgleichgewichts notwendigen Thioredoxin- und Glutaredoxin-Systeme [10, 13] und die Abhängigkeit von der Zufuhr externer Aminosäuren [15] darauf hin, dass *T. whipplei* auf einen Wirt oder die Symbiose mit anderen Mikroorganismen angewiesen ist [16]. Entsprechend verfügt *T. whipplei* über Transportsysteme für den Import essenzieller Aminosäuren und den extrazellulären Transport von Polysacchariden [13]. Bisher ist der Mensch der einzig bekannte Wirt [17], wobei die Bakterien einen Tropismus für myeloide Zellen zeigen. Neben Mφ als Hauptwirtszellen wurden die Bakterien in einer Vielzahl anderer Zelltypen wie intestinalen Epithelzellen, kapillaren und lymphatischen Endothelzellen, Neutrophilen, Lymphozyten, Mastzellen, glatten Muskelzellen und Plasmazellen nachgewiesen [18, 19]. Da *T. whipplei* sowohl intra- als auch extrazellulär nachgewiesen wurde, ist von einer fakultativ intrazellulären Lebensweise der Erreger auszugehen [12, 18].

Im Jahr 2000 gelangen Raoult *et al.* die Kultivierung einer permanent *T. whipplei*-infizierten humanen Fibroblasten-Zelllinie. In dieser Zelllinie betrug die Verdopplungszeit der Bakterien 18 Tage und somit deutlich länger als die der phylogenetisch nah verwandten Mykobakterien [8]. Die Zufuhr externer Aminosäuren zu einem axenischen Medium, welche von den Bakterien nicht synthetisiert werden können, ermöglichte im Jahr 2003 erstmals die zellfreie Kultivierung [15]. Dieser Fortschritt verkürzte die Verdopplungszeit auf 28 Stunden und legte den Grundstein für die Entwicklung molekularbiologischer Verfahren zur Diagnostik des MW [15]. Seither wurde *T. whipplei* aus verschiedenen biologischen Quellen isoliert [7, 20], wobei sich die unterschiedlichen Stämmen durch eine hohe genetische Heterogenität auszeichnen [11]. Das Auftreten in Abwässern, vor allem in Klärwerksgebieten, die phylogenetische Nähe zu Bodenbakterien und die ausgeprägte Temperaturltoleranz [21] sprechen für eine ubiquitäre Verbreitung des Erregers [11, 20]. Die Widerstandsfähigkeit und die Resistenz von *T. whipplei* gegenüber Glutaraldehyd [22] scheint durch die phänotypische trilaminäre Zytoplasmamembran vermittelt zu sein, die von einer Zellwand aus Peptidoglykan umgeben und von einer äußeren symmetrischen Membran umschlossen wird [12]. Das

Überleben in der Umwelt könnte durch die Ausbildung von Sporen gewährleistet werden. Auch wenn bislang keine Sporen von *T. whipplei* identifiziert wurden, verfügt *T. whipplei* über Regulationsfaktoren, die für die Sporulation notwendig wären [10].

Nach aktuellem Stand der Forschung ist von einer fäkal-oralen [20, 23] oder oral-oralen [24] Übertragung von *T. whipplei* auszugehen. Durch den Nachweis der Bakterien in bronchoalveolären Lavage Proben existieren neben der oralen Transmissionsroute auch Hinweise für eine respiratorische Übertragung [25, 26]. Keita *et al.* wiesen die Erreger in 48 % - 75 % der Stuhlproben von afrikanischen Kindern < 4 Jahre nach, sodass eine Primärinfektion mit *T. whipplei* in der Kindheit angenommen wird [27-29]. Die Primärinfektion ist in der Regel selbstlimitierend und geht mit der Ausbildung einer protektiven zellulären und humoralen Immunität gegen *T. whipplei* einher [30-32]. In MW-Patienten bleibt die Ausbildung jener protektiven Immunantwort aus, sodass diese als Entstehungsrund der Erkrankung postuliert wird [33, 34]. In MW-Patienten besiedelt *T. whipplei* nach erfolgter Aufnahme den Gastrointestinaltrakt und wird nach Passage der intraepithelialen Barriere von den Mφ der Lamina propria phagozytiert [35]. Innerhalb der Mφ repliziert und akkumuliert *T. whipplei*, ohne dass MW-Patienten eine adäquate protektive intestinale Entzündungsreaktion ausbilden [35]. Die Anzahl der T-Lymphozyten ist sowohl im Duodenum als auch im Blut von MW-Patienten reduziert [35]. Zudem sind MW-Patienten durch eine niedrige *cluster of differentiation* (CD)4/CD8-Ratio, eine verminderte *T. whipplei* spezifische Reaktion der T-Helfer (Th)1-Lymphozyten [30, 34, 36-38] und eine verminderte serologische Reaktion auf *T. whipplei* Proteine charakterisiert [39]. Während das Gesamtlysate von *T. whipplei* in gesunden Individuen periphere und mukosale *T. whipplei*-spezifische Th1-Lymphozyten aktiviert, wird bei MW-Patienten nach Stimulation keine entsprechende Th1-Antwort ausgelöst [30]. Explizite antigene Epitope für *T. whipplei* sind bisher nicht bekannt, jedoch wurde in einem serologischen, proteomischen Ansatz GrpE, ein Kofaktor des Hitzeschockproteins 70 (Hsp70), als Kandidaten-Antigen identifiziert, das spezifische B-Lymphozyten-Antworten induziert [40]. In Bezug auf andere opportunistische Infektionen sind MW-Patienten immunkompetent, sodass die verminderte Immunantwort durch immunologische Faktoren bedingt zu sein scheint [41]. Mit dem gehäuft Vorkommen der humanen Leukozytenantigene (HLA) DRB1*13 und DQB1*06 [42], eines Interleukin (IL)-16 Polymorphismus [43] und weiteren Polymorphismen, die die Zytokinproduktion in Richtung Th2-Aktivität modulieren [44], sowie der Häufung von MW in Familien [45-47] existieren Hinweise für prädisponierende Faktoren, die Individuen lebenslang für systemische (Re-) Infektionen mit *T. whipplei* empfänglich machen [48].

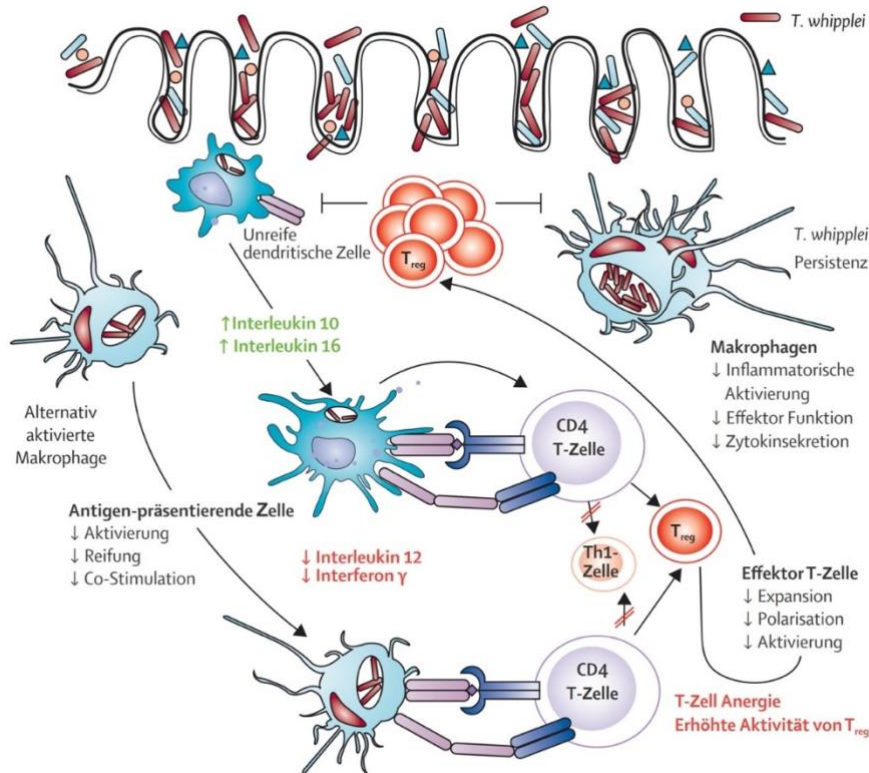


Abbildung 1: Pathogenese des MW.

Die Anwesenheit von Interleukin (IL)-10 und IL-16 bei gleichzeitigem Fehlen von Interferon (INF)- γ und IL-12 resultiert in einer unvollständigen Reifung der antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und infolgedessen in einer ineffizienten Antigenpräsentation. Die Funktionalität antigenspezifischer Th1-Lymphozyten wird inhibiert, während die Proliferation von regulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}) stimuliert wird. Resultierend werden die M ϕ alternativ aktiviert und die Persistenz von *T. whipplei* ermöglicht. Veröffentlicht mit Genehmigung von Elsevier [49].

1.2 Grundlagen für das Verständnis der Interaktion von Erregern und der zellulären Immunantwort

Das humane Immunsystem lässt sich nach funktionellen Gesichtspunkten in die angeborene (innate) und die erworbene (adaptive) Immunität unterteilen. Durch das Zusammenspiel beider Systeme werden die zentralen Funktionen des Immunsystems gewahrt und pathogene, körperfremde Zellen adäquat bekämpft.

Überwindet ein Pathogen die anatomischen und chemischen Barrieren des Körpers, trifft es auf die zelluläre Abwehr der angeborenen Immunität. Hierbei exprimieren antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie Monozyten, M ϕ , neutrophile Granulozyten oder dendritischen Zelle (DC) lösliche und membrangebundene Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptor*), die Pathogene anhand konservierter molekularer Muster (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*) erkennen [50, 51]. Die Aktivierung der APZ resultiert in der Ausbildung einer schnellen, unspezifischen Immunantwort, die die Ausbreitung der Krankheitserreger eindämmt bis sich die Zellen der erworbenen Immunität ausbilden. APZ können als Reaktion auf invasive Pathogene direkte Effektorfunktionen ausführen oder Entzündungsmediatoren produzieren [52, 53]. Zu den direkten Effektorfunktionen gehört die Phagozytose und Eliminierung der Pathogene, beispielsweise durch M ϕ , indem diese reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies bilden [54]. APZ produzieren zudem Zytokine und Chemokine, eine Untergruppe sezernierter Proteine, die neutrophile Zellen und Monozyten aus dem Blut an den Infektionsherd locken und über eine immunologische Signalkaskade die adaptive

Immunantwort aktivieren [52]. Die Aktivierung der adaptiven Immunantwort zählt neben der ersten Abwehr von Krankheitserregern zu der zentralen Aufgabe des angeborenen Immunsystems. Um die Funktion adäquat auszuführen, prozessieren APZ die phagozytierten Pathogene und präsentieren diese als kurze Antigenpeptide über *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle auf ihrer Oberfläche [55]. Die Zellen des adaptiven Immunsystems, die Lymphozyten, binden an die MHC:Peptid-Komplexe und werden ihrerseits aktiviert [56]. Lymphozyten sind im Gegensatz zu den APZ der angeborenen Immunabwehr durch eine hohe Spezifität, ihre Flexibilität in Art und Stärke der Reaktion sowie die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gekennzeichnet. Sie besitzen auf ihrer Oberfläche ein nahezu unbegrenztes Arsenal hoch variabler Antigenrezeptoren, die die Anpassung an die Diversität der pathogenen Mikroorganismen ermöglichen [52].

Während B-Lymphozyten extrazelluläre Antigene über membrangebundene Rezeptoren (B-Lymphozyten-Rezeptoren) detektieren [52], sind T-Lymphozyten für die Erkennung intrazellulärer, APZ präsentierter Antigene verantwortlich. Sie erkennen die MHC:Peptid-Komplexe auf der Oberfläche von APZ über einen spezifischen T-Lymphozyten-Rezeptor (T-Zell-Rezeptor, TzR). Neben dem TzR verfügen T-Lymphozyten über einen der beiden Korezeptoren, CD4 oder CD8, über dessen Expression zwei Subgruppen von Effektorzellen unterschieden werden: CD4⁺ T-Helfer Lymphozyten und CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, *cytotoxic T cells*).

CD8⁺ T-Lymphozyten erkennen endogene Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden sind [55, 57]. Sie differenzieren nach ihrer Aktivierung zu CTL, die primär virusinfizierte Zellen durch zytotoxische Effektormoleküle wie Perforine und Granzyme bekämpfen [58]. Die im Verlauf einer bakteriellen Infektion phagozytierten Erreger werden über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert [55]. Die Bindung des TzR an diesen MHCI:Peptid-Komplex stellt das erste Signal für die T-Lymphozyten-Aktivierung dar. Diese Aktivierung ist durch eine kurzzeitige Expression des CD40-Liganden (CD40L, CD154) sowie des Aktivierungsmarkers CD69 [59, 60] und die Differenzierung von antigenspezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten charakterisiert [61]. Das zweite Signal für die Aktivierung der T-Lymphozyten entspricht der Kostimulation [56]. Die Detektion von PAMP durch PRR induziert in APZ die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86 oder CD80 [62, 63], die mit CD28 auf Seite der T-Lymphozyten interagieren [64]. Fehlt dieses kostimulatorische Signal, kommt es zur unvollständigen T-Lymphozyten-Aktivierung oder Anergie [65]. In Abhängigkeit vom vorherrschenden Zytokinmilieu, dem dritten Signal der Aktivierung, können CD4⁺ T-Lymphozyten unter anderem in Th1-, Th2- und Th17- Lymphozyten oder in regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg}) differenzieren und die Immunantwort durch divers sekretierte Zytokine steuern [66, 67]. Aktivierte Th1-Lymphozyten produzieren Interferon (IFN)- γ , ein Zytokin, das die Mechanismen zur Abtötung intrazellulärer Pathogene von M ϕ verstärkt und natürliche Killerzellen (NK) aktiviert [68]. Th2-Lymphozyten hingegen sekretieren vermehrt IL-4 und IL-13 und sind für die Eliminierung extrazellulärer Pathogene und die Antikörperproduktion der B-Lymphozyten von Bedeutung [69]. Äquivalent zu CD8⁺ CTL existieren CD4⁺ CTL, die zytotoxische Granula mit Granzym B und Perforin sekretieren und befähigt sind, die MHCI:Peptid-Komplex präsentierenden Targetzellen direkt zu bekämpfen [70, 71].

Eine Besonderheit der Antigenpräsentation stellt die Kreuzpräsentation dar, ein alternativer Aktivierungsweg, bei dem exogene Antigene über MHC-Klasse-I präsentiert und von CD8⁺ T-Lymphozyten detektiert werden [72-74].

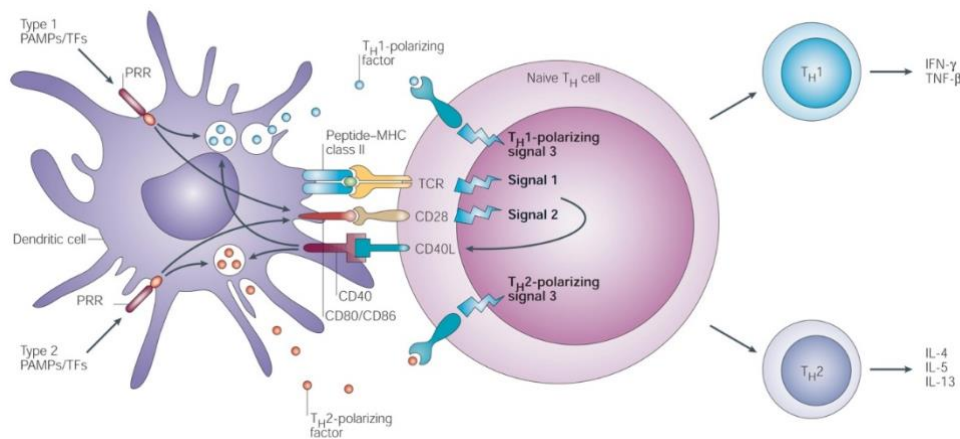


Abbildung 2: Aktivierung von T-Lymphozyten durch APZ.

Nach PAMP-Detektion und Phagozytose werden prozessierte Peptidantigene auf MHC-Molekülen präsentiert. Naïve T-Lymphozyten binden bei entsprechender Spezifität des TzR an den MHC:Peptid-Komplex und erhalten ein erstes Aktivierungssignal. Ein zweites Signal erhalten die T-Lymphozyten durch die Bindung von CD80/CD86 an CD28. Das vorherrschende Zytokinmilieu wird durch die Art des prozessierten Antigens beeinflusst und stellt das dritte Signal der vollständigen T-Lymphozyten Aktivierung und Differenzierung dar. Veröffentlicht mit Genehmigung von Springer Nature [56].

Monozyten und Mφ spielen in der angeborenen und erworbenen Immunität eine bedeutende Rolle [75-77]. Sie übernehmen primäre Effektorfunktionen bei der Eliminierung von Pathogenen und agieren zudem als professionelle APZ, wodurch sie für die Aktivierung der spezifischen T-Lymphozyten-Antwort von Bedeutung sind [78, 79]. Mφ sind mit einer Vielzahl von PRR wie den *Toll-like*-Rezeptoren (TLR), dem Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptor CD14 sowie Mannose- und Scavenger-Rezeptoren und Molekülen zur Antigenpräsentation ausgestattet [80]. Dieses Repertoire ermöglicht die effektive Erkennung von Antigenen sowie deren Internalisierung und Präsentation, wodurch Mφ die funktionelle Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität darstellen [81, 82].

Monozyten des peripheren Blutes sind eine heterogene Zellpopulation, die sich aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks entwickelt [83]. Etwa 10% aller zirkulierenden Leukozyten sind Monozyten [84]. Nachdem sie das Knochenmark verlassen, zirkulieren sie als CD14⁺ Monozyten für circa ein bis zwei Tage im peripheren Blutstrom, bevor sie in das Gewebe einwandern und in Abhängigkeit endogener oder exogener Faktoren zu Gewebsmakrophagen oder DC differenzieren [85, 86]. Abhängig von ihrer Lokalisation werden die Gewebsmakrophagen als Alveolarmakrophagen (Lunge), Mikroglia (Zentrales Nervensystem, ZNS), Osteoklasten (Knochen) oder Kupffer-Zellen (Leber) klassifiziert [87, 88]. Die Aufnahme und Präsentation von Antigenen ist, ungeachtet ihrer Lokalisation, die primäre Funktion aller Gewebsmakrophagen [84].

Mφ werden, angelehnt an die Th-Klassifikation der T-Lymphozyten, in klassisch aktivierte Mφ1 und alternativ aktivierte Mφ2 unterschieden [89-91]. Die Definition der Mφ2 wurde um die Subgruppen Mφ2a, Mφ2b und Mφ2c erweitert, um verschiedene Aktivierungsmöglichkeiten abzubilden [82, 92-94]. Der Aktivierungszustand der Mφ ist dynamisch und reversibel [75-77, 95-97]. Mφ differenzieren *in vivo* in eine heterogene Population von Subtypen, die, abhängig von einem sich permanent adaptierenden Gewebsumilieu, ständigen Anpassungen unterliegt [79, 86, 95, 97-99]. So bestimmen Zytokine, Chemokine, PAMP, Fettsäuren, Immunglobuline, Hormone sowie adrenerge und cholinerge Mediatoren die Funktionalität und den Phänotyp der Mφ [96]. Die Unterteilung in klassisch aktivierte Mφ1 und alternativ aktivierte Mφ2 repräsentiert folglich lediglich die zwei Extreme der divergenten

Polarisation in einem breiten Spektrum von Phänotypen mit fließenden Übergängen und liefert kein Abbild des plastischen Kontinuums [92, 100, 101].

Klassisch aktivierte Mφ1 sind Effektorzellen der angeborenen Immunantwort und weisen Rezeptoren zur Induktion der Phagozytose humanpathogener Erreger (CD16), zur Antigenpräsentation (HLA-DR) und zur Kostimulation (CD80/CD86) auf [102, 103]. Sie sind durch einen IL-12^{high}, IL-23^{high}, IL-10^{low} Phänotyp gekennzeichnet [104] und sezernieren die inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF)-α, IL-1β, IL-6, IL-12 und Chemokine wie CC-Chemokin Ligand (CCL)-2 sowie reaktive Sauerstoffspezies [79, 102, 104, 105]. Als pro-inflammatorische Effektor-Mφ verfügen Mφ1 über eine erhöhte mikrobizide Aktivität und sind primär für die Eliminierung intrazellulärer Pathogene verantwortlich [92]. Ihre Aktivität ist für die Immunabwehr von elementarer Bedeutung, muss jedoch strikt reguliert werden, um Schädigungen des körpereigenen Gewebes zu verhindern. *In vivo* resultieren Mφ1 aus der Stimulation mit TLR-Liganden wie bakteriellem LPS oder den pro-inflammatorischen Zytokinen IFN-γ und IL-1β [82, 92]. Auf genregulatorischer Ebene wird die Expression der Mφ1-Markerproteine durch die Transkriptionsfaktoren NFκB, AP-1, C/EBPβ, PU.1 und die *IFN-regulatory factors* (Interferon regulatorische Faktoren, IRF) gesteuert [106-108]. *In vitro* wird eine Differenzierung in den Mφ1-Phänotyp durch die Zugabe von *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) zu CD14⁺ Zellen des peripheren Blutes erreicht [109].

Alternativ aktivierte Mφ2 vermitteln, konträr zu den Mφ1, eine immunologische Toleranz [92]. Mφ2 entstehen als Antwort auf einen Th2-Stimulus, beispielsweise durch die Zytokine IL-4, IL-10, IL-13 und *transforming growth factor* (TGF)-β [79, 100]. Zudem wird die Polarisierung zum Mφ2-Phänotypen durch die Transkriptionsfaktoren *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 6 und den *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* reguliert [79, 110]. Mφ2 sind durch einen IL-12^{low}, IL-23^{low}, IL-10^{high}, TGF-β^{high} Phänotypen charakterisiert [84, 104], sekretieren den IL-1 Rezeptorantagonisten und weisen eine erhöhte Expression des Scavenger-Rezeptors CD163, des Mannose-Rezeptors CD206 und Stabilin-1 auf [104, 111-113]. Mφ2 exprimieren anstelle reaktiver Sauerstoffspezies hohe Level an Arginase 1 [102], welche die für die Kollagensynthese, Zellproliferation und Fibrose notwendige Polyaminproduktion katalysiert [114]. Mφ2 haben eine besondere Bedeutung beim Abklingen von Entzündungen und der Gewebserneuerung [79, 94, 114]. *In vitro* lassen sich Mφ2 durch die Polarisierung mit dem *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) generieren [115].

Tabelle 1: Gegenüberstellung klassisch aktivierter (M1) und alternativ aktivierter (M2) Mφ.

Charakteristikum	Mφ1	Mφ2
Polarisierende Stimuli	IFN-γ, TLR-Liganden, TNF, GM-CSF	IL-4, IL-13, IL-10, M-CSF
<i>in vitro</i> Morphologie	Rund/oval	Spindelförmig
Phänotyp	Pro-inflammatorisch	Anti-inflammatorisch
Zytokine	IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, TNF-α	IL-1ra, IL-10, TGF-β
Immunrezeptoren	CD16, CD64, HLA-DR	Stabilin-1, CD206, CD163, CD14
Chemokine	CCL-2, CCL-5, CXCL-8-11	CCL-1, CCL-2, CCL-17, CCL-18
Antimikrobielle Moleküle	NO Synthetase (iNOS), NO, O ₂ ⁻	Arginase, Harnstoff
Funktion	Mikrobizide Aktivität	Gewebserneuerung, Tumorprogression

1.3 Immunantworten beim Morbus Whipple

Die Akkumulation der *T. whipplei* Bakterien in den Mφ der Lamina propria ist charakteristisch für das Krankheitsbild des MW, ohne dass von diesen eine spezifische Immunreaktion ausgeht [35]. *T. whipplei* infizierte Mφ exprimieren verminderte Level an CD 11b⁺ und polarisieren sowohl im Duodenum als auch im Blut zu alternativ aktivierten Mφ2 mit einer erhöhten IL-10 und CCL-18 Expression [35, 116-118]. Die Mφ2 Aktivierung äußert sich funktionell in einer verminderten Produktion von Stickstoffradikalen (NO) und in einem selektiv für *T. whipplei* reduzierten oxidativen Burst [35]. MW-Patienten zeigen eine verminderte Nitrit-Produktion im Duodenum sowie eine reduzierte Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in den peripheren Monozyten des Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) [35]. Die Expression von IL-10 und TGF-β ist sowohl in *in vitro* infizierten Monozyten und Mφ [119] als auch in der duodenalen Mukosa unbehandelter MW-Patienten erhöht [35, 116, 120]. *T. whipplei* unterdrückt die IL-12 und IFN-γ Expression der Mφ von MW-Patienten [33, 34, 116], wodurch die Reifung der Phagosomen inhibiert, die Thioredoxin-Expression vermindert und die IFN-γ Produktion der T-Lymphozyten reduziert wird [34, 117]. Infolgedessen sind die Mφ von MW-Patienten nicht befähigt, *T. whipplei* zu degradieren und die bakteriellen Antigene effizient zu präsentieren [38, 121]. Weiterhin induziert *T. whipplei* in Mφ die Sekretion von IL-16 und Typ 1 IFN, wodurch das Überleben der Bakterien im sauren Milieu der späten Endosomen ermöglicht wird [38, 119, 122, 123]. Die Sekretion von Typ 1 IFN begünstigt die intrazelluläre Replikation von *T. whipplei* und induziert die Apoptose der Mφ [122, 124], wodurch eine systemische Ausbreitung über die Blutbahn – vermutlich über infizierte Monozyten [125] – ermöglicht wird.

1.4 Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik des Morbus Whipple

Der **klassische MW** beschreibt die chronische Manifestation der *T. whipplei* Infektion im Darm, welche durch den Nachweis PAS⁺ Mφ charakterisiert ist. Während eine Infektion mit *T. whipplei* in der Regel selbst-limitierend ist und zu einer protektiven zellulären und humoralen Immunität gegen den Erreger führt [30-32], entwickelt ca. 1 von 1.000.000 Individuen das Krankheitsbild des klassischen MW. Männer europäischer Abstammung und mittleren Alters sind vermehrt von der Erkrankung betroffen [16, 41]. Gewichtsverlust (90 %), Gelenkschmerzen oder Arthritis (80 %), Durchfall (75 %) und Unterbauchschmerzen (60 %) sind die Hauptmanifestationen des MW [126-129]. Der Dünndarm ist der primäre Infektionsort der *T. whipplei* Bakterien [16]. Der im Zuge der chronischen Infektion auftretende Durchfall und der resultierende Gewichtsverlust wird auf eine zugrundeliegende Malabsorption zurückgeführt, welche sich in 67 % der MW-Patienten zu einer schweren Kachexie entwickelt [49]. In 63 % der MW-Patienten gehen Gelenkbeschwerden dem Auftreten gastrointestinaler Symptome voraus [130]. Man spricht daher von einer sogenannten „2-Stadien-Krankheit“ mit dem Prodromalstadium, meist charakterisiert durch unspezifische Gelenkbeschwerden, und dem *steady state*, in welchem Gewichtsverlust und Diarrhö vorherrschen [128]. Die durchschnittliche Zeitspanne zwischen beiden Stadien beträgt 6 Jahre [128]. In dieser Zeit werden MW-Patienten aufgrund der unspezifischen Symptomatik mehrheitlich gegen andere Erkrankungen, zumeist gegen rheumatoide Arthritis [131], behandelt [16, 129, 132]. Aufgrund der fehldiagnostizierten rheumatischen Erkrankung werden MW-Patienten initial oft mit Immunsuppressiva therapiert. Die jahrelange immunsuppressive Behandlung kann das Auftreten eines inflammatorischen Immunrekonstitutionssyndroms begünstigen und sich negativ auf den Krankheitsverlauf des MW auswirken [133-135].

Bei der Hälfte der MW-Patienten lässt sich *T. whipplei* in der Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor) nachweisen, mit welcher die Erreger in das ZNS vordringen [136, 137]. In 20-40 % der Liquor-positiven

MW-Patienten manifestiert sich die Infektion im ZNS und führt zu Kopfschmerzen, kognitiven Funktionsstörungen, Epilepsie und Ataxie, aber auch zu einer Beteiligung der peripheren Nerven und des Rückenmarks [127, 138]. Die neurologischen Symptome entwickeln sich meist im späten Verlauf der Krankheit und führen zu einer Verschlechterung der Prognose des MW [138-140].

Lokalisierte Infektionen treten bei etwa 15% der MW-Patienten auf. Hierbei manifestiert sich die Infektion lokal auf ein oder mehrere extraintestinale Organe, ohne dass eine Beteiligung des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen werden kann [128]. Beispiele für lokalisierte Infektionen sind Infektionen des ZNS [129, 136], ein isolierter Gelenkbefall [129, 141], Lymphadenopathie oder Uveitis [49, 142]. Eine Sonderform der lokalisierten Infektion ist die *T. whipplei* induzierte Endokarditis [143, 144]. Bei einer *T. whipplei* induzierten Endokarditis sind die Erreger nicht in anderen Organen nachweisbar, sodass diese Manifestation vom klassischen MW mit Befall der Herzklappe abzugrenzen ist [145-149]. *T. whipplei* ist der vierthäufigste Erreger (6,3%) einer isolierten kulturnegativen Endokarditis [143]. Die *T. whipplei* induzierte Endokarditis führt nur in seltenen Fällen zu positiven Duke-Kriterien für die klinische Einteilung als infektiöse Endokarditis, sodass die Diagnose nur durch den positiven Erregernachweis an der explantierten Klappe gestellt werden kann [129, 150].

Akute, selbst-limitierende Infektionen in Form von Fieber, Lungenentzündungen oder einer Gastroenteritis können ebenso durch *T. whipplei* hervorgerufen werden [25, 27, 31]. *T. whipplei* wurde in 3% bronchoalveolärer Lavage-Proben von Patienten mit Pneumonie und in 15% der Stuhlproben von Kindern mit einer milden Gastroenteritis nachgewiesen [25, 26]. Die resultierende Ausbildung *T. whipplei* spezifischer Antikörper wurde beschrieben [31]. Bisher gibt es keine Hinweise dafür, dass akute, selbst-limitierende Infektionen einer chronischen *T. whipplei* Infektion vorhergehen.

Die **asymptomatische Trägerschaft** stellt das vierte Erscheinungsbild des MW dar [20, 151]. In Europa sind in etwa 1,5-4% der Gesamtbevölkerung asymptomatische Träger von *T. whipplei* [23, 128, 152]. Die Pathogene wurden in 1-11% der Stuhlproben gesunder Kontrollpersonen detektiert [20, 152], wobei eine Akkumulation in einer Kohorte von Klärwerksmitarbeitern auftrat. Innerhalb der Klärwerksmitarbeiter waren 25% stuhlpositiv auf *T. whipplei* [20]. Der Anteil speichelpositiver Probanden dieser Kohorte betrug 2,2%, während *T. whipplei* im Speichel von 0,2% gesunder Individuen nachgewiesen wurde [23]. Der Nachweis einer positiven Speichelprobe geht mit einem positiven Stuhlbefund einher [23], wobei die Bakterienlast der Stuhlproben höher ist als die des Speichels [23, 153]. Dieser Befund legt nahe, dass der Darm der präferierte Infektionsort von *T. whipplei* ist [17]. Zudem ließ sich in Stuhlproben symptomatischer MW-Patienten eine höhere Bakterienlast nachweisen als in asymptomatischen Trägern [23]. *T. whipplei* ist in humanem Stuhl und Speichel lebensfähig [23], was für eine Mensch-zu-Mensch Übertragung spricht.

Aufgrund des diversen Manifestations- und Symptomspektrums im Prodromalstadium und der geringen Prävalenz des MW erfolgt die Diagnose des MW meist erst Jahre nach dem Auftreten der ersten Symptome [154]. In dieser Zeit erhalten Patienten oftmals eine inadäquate Therapie gegen MW [16, 129, 132]. Eine zeitnahe, adäquate Behandlung des MW mit Antibiotika [137, 155] ist für den Krankheitsverlauf jedoch essenziell, da die Erkrankung ohne Therapie meist tödlich verläuft [128].

Die Primärdiagnose des MW wird zumeist anhand des histologischen Nachweises PAS⁺ Mφ in Duodenalbiopsien gestellt [156, 157]. Diese Methodik hat sich zum Goldstandard der MW Diagnostik und der Therapiekontrolle entwickelt [157, 158], zeigt jedoch bei extrem hoher Spezifität eine leicht verminderte Sensitivität gegenüber der *T. whipplei* spezifischen Immunhistochemie (IHC) [139, 159]. PAS⁺ Mφ können ebenfalls bei Infektionen mit *Rhodococcus equi*, *Mycobacterium avium* oder Corynebakterien auftreten [128, 157], wodurch Zusatzfärbungen zur Absicherung der Diagnose

notwendig sind. Die Diagnostik mittels PAS-Färbung duodenaler Biopsien ist in ca. 15 % der MW-Patienten, jenen Patienten mit einer lokalisierten Infektion [128], falsch-negativ. Der Nachweis lokalisierter Formen des MW kann durch positive Befunde der *T. whipplei* spezifischen Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) oder IHC aus dem betroffenen Organ oder Gewebe erfolgen [16, 23]. Hierbei schwächt das positive Signal der PCR und IHC im Zuge einer erfolgreichen Behandlung ab, sodass diese Methoden zur Einschätzung des Therapieerfolgs herangezogen werden können [159]. Auch die PAS-Färbung bietet die Möglichkeit des Einsatzes bei der Therapiekontrolle, jedoch kann die Färbung über Jahre hinweg positiv bleiben. Die verminderte Intensität der Farbgebung und das Verschwinden von Mφ des Typs I wird als Therapieerfolg gewertet [158], benötigt gegenüber der PCR und IHC jedoch eine längere Zeit der Nachverfolgung.

Für den molekularen Nachweis mittels PCR wurden diverse Target-Gene wie das *16S rRNA* Gen [160], das *hsp65* Gen [161], das *rpoB* Gen [162] und verschiedene repetitive Bereiche [163] analysiert. Der Nachweis eines *T. whipplei*-spezifischen Segments innerhalb des *rpoB* Gens, welches für die β -Untereinheit der RNA Polymerase kodiert, lieferte vielversprechende Resultate [162, 164]. Die PCR ist in ihrer Sensitivität der PAS-Färbung überlegen [165], zeigt jedoch eine verminderte Spezifität, da auch gesunde Träger positive Testergebnisse im Stuhl und Speichel aufweisen [23]. Als weiteres Untersuchungsmaterial postulierten Relman *et al.* den molekularen *T. whipplei* Nachweis im Blut als erfolgsversprechende, gering-invasive Alternative zur bisherigen Diagnostik [7]. PCR-Analysen des Vollblutes [23] und isolierter PBMC [166] wiesen einen positiven prädiktiven Wert (PPW) von 100 % auf, waren jedoch in ihrer Sensitivität limitiert. Zudem birgt die PCR-Technik das Risiko falsch-positiver Befunde durch Kontaminationen, die während der Probenahme, Isolierung und Amplifikation der Nukleinsäuren auftreten können [17, 167]. Um falsch-positive Befunde zu reduzieren, sollte die Amplifizierung von *T. whipplei* DNA durch eine anschließende Sequenzierung verifiziert werden [129, 168]. Grundsätzlich ist die Diagnose des MW nie auf Basis eines einzelnen positiven Testergebnisses zu stellen, sondern stets durch mindestens eine weitere unabhängige Methode zu bestätigen [169].

Die PAS-Färbung, die *T. whipplei* spezifische IHC und die PCR ermöglichen den Nachweis der Bakterien, lassen jedoch keine Rückschlüsse auf die Vitalität der Erreger zu. Hier bietet die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung einen Vorteil. Diese Methode ist aufgrund der Detektion von RNA geeignet, vitale, metabolisch aktive Bakterien von toten zu unterscheiden [18, 150]. Die Detektion vitaler Bakterien wäre ebenfalls durch die Anzucht in Kultur gegeben, findet jedoch aufgrund der Generationszeit von 18 Tagen in der Diagnostik des MW keine Anwendung [8]. Aufgrund des Nachweises *T. whipplei*-spezifische Antikörper im Serum von gesunden Individuen und asymptomatischen Trägern sind serologische Tests nicht zur Diagnose des MW geeignet [8, 32].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Der aktuelle Forschungsstand lässt die Annahme zu, dass die chronische Manifestation des MW mit prädisponierenden immunologischen Faktoren assoziiert ist [41]. So ist neben einer Assoziation mit den Allelen DRB1*13 und DQB1*06 [42], einem IL-16 Polymorphismus [43] und einer Relevanz von IRF4 [170] die alternative Aktivierung der gewebeinfiltrierenden Mφ beschrieben [35]. Bisher ist unzureichend geklärt, ob die Mφ2 Aktivierung eine Voraussetzung für die *T. whipplei* Infektion ist oder ob das Pathogen den Mφ2 Phänotyp in prädisponierten Patienten induziert. Zudem gibt es keine Erkenntnisse, ob die potentiell *T. whipplei* induzierte Änderung der zellulären Immunantwort geeignet ist, frühe Stadien eines systemischen oder isolierten MW zu diagnostizieren.

Die vorliegende Arbeit prüft die Hypothese, dass die Mφ von MW-Patienten in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt sind, *T. whipplei* zu degradieren und bakterielle Antigene effektiv zu präsentieren. Die

aus der ineffizienten Präsentation von *T. whipplei* Antigenen resultierende inadäquate T-Lymphozyten-Reaktivität ist ein wesentlicher Pathomechanismus des MW. Die im Vergleich zu nicht suszeptiblen Personen veränderte Mφ-Aktivierung und T-Lymphozyten-Reaktivität kann eine Basis für minimalinvasive diagnostische Verfahren für einen frühen lokalen MW sein.

Daraus ableitend wurden die folgenden Fragen untersucht:

1. Ist eine inadäquate Präsentation von *T. whipplei* Antigenen durch die Mφ von MW-Patienten Ursache für das Fehlen einer *T. whipplei*-spezifischen T-Lymphozyten-Reaktivität, bzw. kann eine gestörte *T. whipplei* spezifische T-Lymphozyten-Reaktion von MW-Patienten durch die Verwendung rekombinanter Proteine oder die direkte Transfektion zur Antigen-Präsentation umgangen werden?
2. Beeinflusst *T. whipplei* den Phänotyp *in vitro* differenzierter Mφ? Welche Mφ-Gene steuern die Etablierung einer Infektion?
3. Können *T. whipplei* infizierte Monozyten für die systemische Ausbreitung des Erregers verantwortlich sein und zur Diagnostik eines frühen MW genutzt werden?

Durch das Zusammenspiel der Fragestellungen soll Aufschluss über die grundlegende Rolle der Mφ bei der mangelnden entzündlichen Aktivität des Immunsystems der MW-Patienten gegeben und weitere Erkenntnisse über die systemische Verbreitung des Erregers – und damit das Verständnis der Immunpathologie des MW – gewonnen werden.

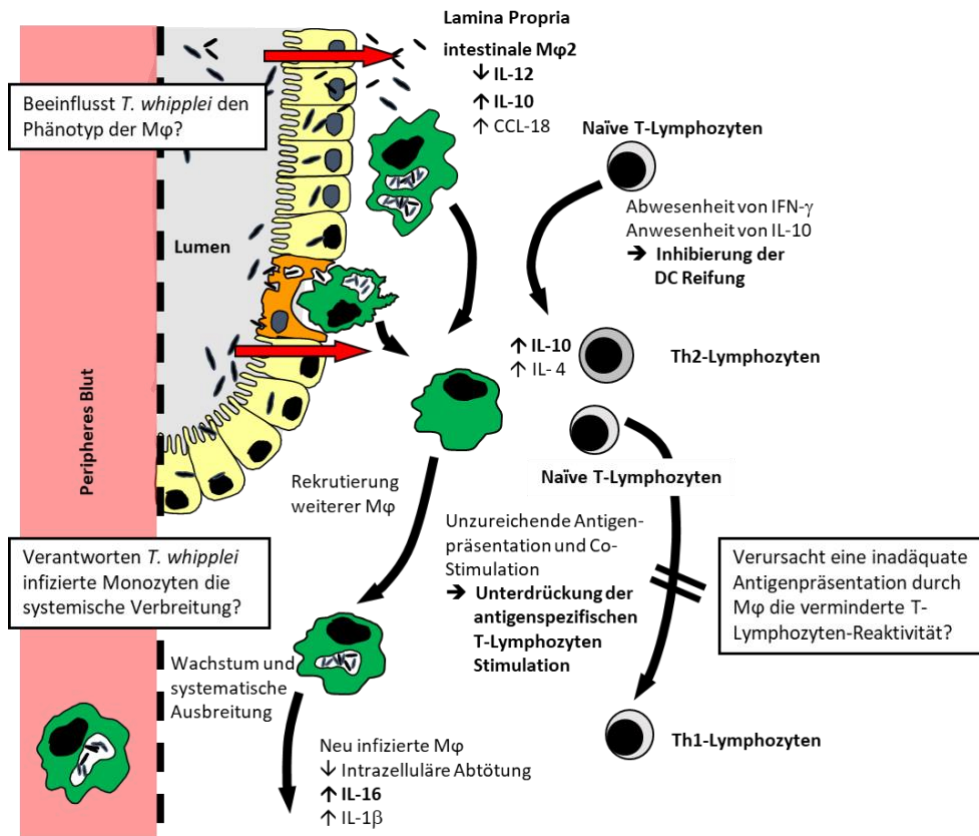


Abbildung 3: Einbettung der Fragestellungen in den immunpathologischen Kontext.

T. whipplei dringt nach vermutlich fäkal-oraler Übertragung durch die epitheliale Barriere in die Lamina propria ein. Hier phagozytieren Mφ2 mit verminderter Degradationsfähigkeit und unreife dendritische Zellen (DC) die Erreger. Die Reifung der DC wird aufgrund der Anwesenheit von IL-10 und IL-16 und der Abwesenheit von Interferon (IFN)-γ und IL-12 verhindert, sodass es zur ungenügenden antgenspezifischen Stimulation naiver T-Lymphozyten kommt. Dies resultiert in einer prädominanten Immunregulation, einer unzureichenden Stimulation und einer alternativen Polarisierung, welche die systemische Ausbreitung der Pathogene begünstigt [16, 171]. Nachgedruckt mit Genehmigung von Elsevier [16]. Modifizierungen wurden durch den Autor genehmigt.

2 Material und Methoden

2.1 Technische Geräte

Tabelle 2: Technische Geräte.

Gerät	Bezugsquelle
Agilent Tape Station 2200	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Bakterienbrutschrank	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, DE
Begasungsbrutschrank	BB 15 Function Line; Heraeus, Hanau, DE
Bioanalyzer	2100; Agilent, Santa Clara, CA, USA
Dampfdruckkochtopf	WMF Easy Transtherm; WMF, Geislingen/Steige, DE
Digitalkamera	Olympus DP20; Olympus, Hamburg, DE
Durchlichtmikroskop	Olympus BX41; Olympus, Hamburg, DE
El Porator 1000	Eigenkonstruktion T. Stroh, AG Sigmund [172]
ELISA-Reader	VersaMax; Molecular Devices, Chicago, IL, USA
FACS Geräte	FACS Calibur, FACS Canto II; BD, Heidelberg, DE
Gefrierschränke	Thermo Fischer Scientific, Dreieich, DE Heraeus, Hanau, DE
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart, DE
Kühlzentrifugen	Megafuge 1.0R; Heraeus, Hanau, DE Biofuge Fresca; Heraeus, Hanau, DE
Lichtmikroskop	Axiovert 25; Carl Zeiss, Jena, DE
Light Cycler™	Thermo Fischer Scientific, Dreieich, DE
Light Cycler™ Zentrifugenadaptoren	Boehringer Mannheim, Mannheim, DE
Magnetrührer	RCT basic safety control; IKA, Staufen, DE
MidiMACS Magnet	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DE
Mikrotom	2125 RT; Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Multikanalpipette; 100 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Nanodrop®	ND-1000; Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DE
Pipetten; 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Schüttler	KM-2 AKKU; Edmund Bühler, Hechingen, DE
Sicherheitswerkbank	HeraSafe; Heraeus, Hanau, DE
Spektrophotometer	TECAN, Crailsheim, DE
SureScan Mikroarray Scanner	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Thermocycler	T3000; Biometra, Lebrecht, Horsham, PA, USA
Waage	Scout Pro SPU 20; Ohaus Corporation, New York City, NJ, USA
Wasserbad	TW8; Julabo, Seelbach, DE

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Deckgläser; 2x36 mm, 24x50 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Einbettkassetten	Tissue-Tek Uni-Cassette®; Sakura Finetek, Stauf, DE
Einmalküvetten; 6 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Elektroporationsküvetten; 2 mm	Biozym, Oldendorf, DE
Fettstift	Linaris, Wertheim, DE
Filterplatten	BioLegend, Fell, DE
Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Kapillarspitzen; 200 µl	Biozym, Oldendorf, DE
Kryoröhrchen	NUNC, München, DE
Leucosep-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Mikrotiterplatten	Diaclone, Besançon, FR
Objektträger	SuperFrost®; R. Langenbrinck Labor & Medizintechnik, Emmendingen, DE
Parafilm	VWR, Chicago, IL, USA
PCR Reaktionsgefäße; 0,2 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Pipettenspitzen, gestopft; 10 µl	Sorenson BioScience, Salt Lake City, UT, USA
Pipettenspitzen; 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Polystyren Rundbodengefäße	BD, Heidelberg, DE
Reaktionsgefäße; 1500 µl	Eppendorf, Hamburg, DE BD, Heidelberg, DE Biozym, Oldendorf, DE
Serologische Einwegpipetten; 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD, Heidelberg, DE
Spritzenfilter; 0,22 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Vacutainer-Röhrchen, heparinbeschichtet; 10 ml	BD, Heidelberg, DE
Vakuum Flaschenfilter; 0,22 µm	Steritop-GP; Millipore, Darmstadt, DE
Zählkammer	HYCOR Biomedical, Kassel, DE
Zellkulturflaschen; T75	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturplatten	NUNC, München, DE
Zentrifugenröhrchen, konisch; 15 ml, 50 ml	BD, Heidelberg, DE

2.3 Chemikalien und Verbrauchsmittel

2.3.1 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien.

Chemikalie	Bezugsquelle
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, DE
Beriglobin	Sigma-Aldrich, München, DE
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, München, DE
BSA	Sigma-Aldrich, München, DE
DMSO	Sigma-Aldrich, München, DE
Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, DE
Ethanol	Baker, Griesheim, DE
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
FACS™ Lysing Solution; 10x	BD, Heidelberg, DE
Ficoll Paque™ Plus	GE Healthcare, Freiburg, DE
Gentamicin	Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, DE
Hämatoxilin	Dako, Hamburg, DE
Isopropanol	Merck, Darmstadt, DE
Kaisers Glyceringelantine	Merck, Darmstadt, DE
Natriumacid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, DE
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, München, DE
Saponin	Sigma-Aldrich, München, DE
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

2.3.2 Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle 5: Zusammensetzung verwendeter Puffer, Medien und Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung oder Bezugsquelle
ADC	2 g Glukose, 5 g BSA, 0,85 g NaCl in 100 ml dH ₂ O
Antikörperverdünnungspuffer	DakoCytomation, Hamburg, DE
Brefeldin A-Lösung	0,1 mg/ml Brefeldin A (Stammlösung: 5 mg/ml in Ethanol) in PBS
Citratpuffer; pH6	10 mM Zitronensäure; 10 mM NaOH; dH ₂ O
Destilliertes Wasser	Ampuwa, Fresenius, DE
DMEM-Kulturmedium	DMEM, 4,5 g/l Glukose; 25 mM Hepes; 2 mM L-Glutamin; 1 mM Natriumpyruvat; 1x MEM Aminosäuren; 10 % (v/v) FKS (Gibco)
Einfriermedium	FKS, 10 % (v/v) DMSO

Lösung	Zusammensetzung oder Bezugsquelle
Elektroporationspuffer	90 mM Natriumphosphat; 10 mM Magnesiumchlorid; 50 mM Glukose; pH 7,2
Erythrozytenlysepuffer	20 mM KHCO ₃ ; 310 mM NH ₄ Cl; 1 mM EDTA; dH ₂ O
First-Strand Puffer; 5x	250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂ (Invitrogen)
Flüssigmedium zur Anzucht von <i>M. bovis</i> BCG	270 ml Middlebrook 7H9 Bouillon, 0,05 % Tween 80, 30 ml ADC
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, DE
L-Glutamin	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
MACS Puffer	90 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 30 % (w/v) BSA; 1 mM EDTA (v/v)
MEM Non Essential Amino Acids; 100x	Life Technologies, Ober-Olm, DE
Middlebrook 7H9 Bouillon	BD Difco™, Heidelberg, DE
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, DE
Paraformaldehyd-Lösung; 4 %	PBS pH 7,2; 4 % (w/v) Paraformaldehyd
PBA	90 mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 15 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,5 % (w/v) BSA; 0,02 % (v/v) NaN ₃
PBS	PAA, Pasching, AT
PBS/BSA	PBS; 0,5 % (w/v) BSA
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Biochrom, Berlin, DE
R10 Zellkulturmedium	RPMI 1640; 25 mM Hepes; 4 mM L-Glutamin; 10 % (v/v) FCS
RPMI 1640	Gibco by Life Technologies, Ober-Olm, DE
SOC-Medium	2 % Tryptone, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose
TBS	150 mM NaCl, pH 7,5; 10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl, pH 7,5; 10 mM Tris-HCl
TBS/Tween	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl + 0,05 % Tween 20
Tween 80	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

2.3.3 Kommerzielle Testsysteme (Kits) und Enzyme

Tabelle 6: Testsysteme (Kits) und Enzyme.

Testsystem (Kit) oder Enzym	Bezugsquelle
DNA/RNA AllPrep Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
DNase1	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Desoxynukleotide (dNTPs) Mix; 10 mM	Sigma-Aldrich, München, DE
EnVision™ Kit	Dako, Hamburg, DE
Gene Expression Hybridisation Kit	Agilent, Santa Clara, CA, USA
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit	BioLegend, Fell, DE

Testsystem (Kit) oder Enzym	Bezugsquelle
Low Input QuickAmp Labeling Kit	Agilent, Santa Clara, CA, USA
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Real™ Detection System	Dako, Hamburg, DE
RiboLock	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
RNA ScreenTape Ladder	Agilent, Santa Clara, CA, USA
RNA ScreenTape Sample Buffer	Agilent, Santa Clara, CA, USA
RNase free DNase Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
RNeasy MiniKit	Qiagen, Hilden, DE
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Taq DNA Polymerase	Life Technologies, Ober-Olm, DE

2.3.4 Oligonukleotide

Tabelle 7: Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
TW rpoB-HP1	5'- acg agg tcg gat att atc gc Fluorescein - 3'	Tib Molbiol, Berlin, DE
TW rpo	5'- LC Red 640 aca att cgt tat ctc gcg gcc PH - 3'	Tib Molbiol, Berlin, DE
TW rpoB-F4	5'- ctc ggt gtt gat gtt gat cca a - 3'	Tib Molbiol, Berlin, DE
TW rpoB-R	5'- gca ccg ca acct cg gaga aa - 3'	Tib Molbiol, Berlin, DE

2.3.5 Vektoren

Tabelle 8: Vektoren.

Vektor	Eigenschaften	Hersteller
pGrpE_EC	pGUH mit kodierender synthetischer Sequenz für GrpE aus <i>E. coli</i>	AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF, DE
pGrpE_MT	pGUH mit kodierender synthetischer Sequenz für GrpE aus <i>M. tuberculosis</i>	AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF, DE
pGrpE_TW	pGUH mit kodierender synthetischer Sequenz für GrpE aus <i>T. whipplei</i>	AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF, DE

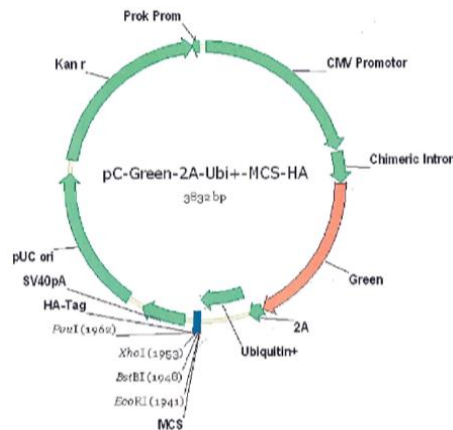


Abbildung 4: pGUH Vektorkarte.

Der 3832 bp pGUH Vektor verfügt neben einer Kanamycin Resistenz (Kan r) über Schnittstellen für EcoRI, BstBI und XhoI in der Multiple Cloning Site (MCS) und eine GFP-Kassette (Green). Zur Generierung der pGrpE Vektoren erfolgte die Insertation der codonoptimierten Sequenz von GrpE aus *E. coli* (594 bp), *M. tuberculosis* (708 bp) und *T. whipplei* (567 bp) in die MCS. Die pGrpE Plasmide wurden von der AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF zur Verfügung gestellt.

2.3.6 Zellstimulanzen

2.3.6.1 Bakterienstämme

Tabelle 9: Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Bezugsquelle
<i>M. bovis</i> BCG	Robert Koch Institut, Übernahme von Dr. Astrid Lewin, Berlin, DE
<i>T. whipplei</i> Twist-Marseille™	ATCC Nummer CCL-171; American Type, Culture Collection

2.3.6.2 Antigene und Stimulanzen

Tabelle 10: Antigene und Stimulanzen.

Antigen oder Stimulanz	Peptid	Konzentration	Bezugsquelle
CD28	Maus	2 µg/ml	BD, Heidelberg, DE
Gluthadion-S-Transferase (GST)	<i>Schistosoma japonicum</i>	22 µg/ml	AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF, DE
GrpE EC	Fusionprotein aus GST und GrpE von <i>E. coli</i>	50 µg/ml	AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF, DE
GrpE MT	Fusionprotein aus GST und GrpE von <i>M. tuberculosis</i>	50 µg/ml	AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF, DE
GrpE TW	Fusionprotein aus GST und GrpE von <i>T. whipplei</i>	50 µg/ml	AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF, DE
Hsp70Ec	Rekombinantes Hsp70 von <i>E. coli</i>	33 µg/ml	AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF, DE
Hsp70Tw	Rekombinantes Hsp70 von <i>T. whipplei</i>	80 µg/ml	AG Kühl/Erben, Charité Berlin, CBF, DE
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	<i>Staphylococcus aureus</i>	2 µg/ml	Sigma, München, DE
<i>T. whipplei</i> Twist-Marseille™	Gesamt-Lysat	10 ⁷ Bakterien/ml	ATCC Nummer CCL-171; American Type, Culture Collection

2.3.6.3 Zytokine und Wachstumsfaktoren

Tabelle 11: Zytokine und Wachstumsfaktoren.

Zytokin oder Wachstumsfaktor	Quelle	Konzentration	Bezugsquelle
GM-CSF (Leukine®)	Hefe	1000 U/ml	Sanofi-Aventis U.S. LLC, Bridgewater, NJ, USA
M-CSF	<i>E. coli</i>	10 ng/ml	Peprotech, Hamburg, DE
Thioredoxin	<i>E. coli</i>	0,5 mg/ml	Sigma, München, DE
rh IL-1β	<i>E. coli</i>	0,5 mg/ml	R&D Systems, Wiesbaden, DE
rh IL-10	<i>E. coli</i>	10 ng/ml	Peprotech, Hamburg, DE
rh IL-16	<i>E. coli</i>	5 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden, DE
rh anti-IL-16	<i>E. coli</i>	0,5 mg/ml	R&D Systems, Wiesbaden, DE
rh IFN-γ	<i>E. coli</i>	200 U/ml	R&D Systems, Wiesbaden, DE
rh TNF-α	<i>E. coli</i>	500 U/ml	R&D Systems, Wiesbaden, DE

2.3.7 Antikörper

2.3.7.1 Immunhistochemische Antikörper

Tabelle 12: Primärantikörper für die Immunhistochemie.

Spezifität	Herkunft	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
<i>T. whipplei</i>	Kaninchen	polyklonal	1:20000	Prof. D. Raoult, Unité des Rickettsies, Marseille, FR [139]

2.3.7.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Analyse von Oberflächen- und intrazellulären Markern wurden die in Tabelle 13 gelisteten, monoklonalen Antikörper verwendet. Alle Antikörper waren muriner Herkunft und direkt mit dem Fluorochrom konjugiert.

Tabelle 13: Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Spezifität	Klon	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle
CCL-18	64507	APC	1:20	R&D Systems, Wiesbaden, DE
CD3	SK7	PerCP	1:50	BD, Heidelberg, DE
CD3	UCHT1	PE-Cyanine7	1:100	eBiosciences, Frankfurt am Main, DE
CD3	SP 34-2	APC	1:50	BD, Heidelberg, DE
CD4	RPA-T4	Pacific Blue	1:50	BD, Heidelberg, DE
CD8	SK1	APCH7	1:100	BD, Heidelberg, DE
CD8	SK1	PerCP	1:20	BD, Heidelberg, DE
CD14	61D3	PerCPCyanine5.5	1:50	eBiosciences, Frankfurt am Main, DE

Spezifität	Klon	Konjugat	Verdünnung	Bezugsquelle
CD16	3G8	FITC	1:20	BD, Heidelberg, DE
CD40L	24-31	FITC	1:20	eBiosciences, Frankfurt am Main, DE
CD68	KiM7	FITC	1:20	AbD Serotec, Düsseldorf, DE
CD69	TP1.55.3	PE	1:00	Beckman Coulter, Krefeld, DE
CD71	DF1513	Alexa647	1:20	AbD Serotec, Düsseldorf, DE
CD86	FUN-1	PerCPCyanine5.5	1:5	BD, Heidelberg, DE
CD163	GHI/61	PE	1:20	BD, Heidelberg, DE
Granulysin	B-L38	FITC	1:100	Antibodies-online GmbH, Aachen, DE
GranzymB	GB11	PE	1:100	BD, Heidelberg, DE
HLA-DR	L243	PerCP	1:20	BD, Heidelberg, DE
IFN- γ	B27	APC	1:100	BD, Heidelberg, DE
IFN- γ	45-15	APC-Vio770	1:100	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DE
Perforin	Delta G9	VioBlue	1:200	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DE

2.3.7.3 Antikörper für die magnetische Zellisolation

Tabelle 14: Antikörper für die magnetische Zellisolation.

Spezifität	Herkunft	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
CD14	Maus	Tük4	1:10	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DE

2.4 Patientenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Transkriptom- und phänotypischen Analysen *in vitro* differenzierter M ϕ sowie für Untersuchungen zur verminderten T-Lymphozyten Aktivität diente arteriell gewonnenes Heparinblut von behandelten MW-Patienten und gesunden Kontrollenpersonen. MW-Patienten wurde durch das Vorliegen von mindestens zwei voneinander unabhängigen, positiven Befunden der PAS-Färbung, der *T. whipplei* spezifischen IHC oder PCR [173] sowie einer passenden Klinik charakterisiert. Die Prozessierung der Blutproben erfolge innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme. Um alters- und geschlechtsabhängige Effekte der Genexpression auszuschließen, wurden für die Transkriptomanalyse Kontrollen gleichen Alters und Geschlechts verwendet [174]. Die Charakterisierung der Untersuchungsgruppen ist Tabelle 15 zu entnehmen.

Für Untersuchungen zur systemischen *T. whipplei* Ausbreitung wurden Duodenalbiopsien, Liquor, EDTA- und Heparinblut von MW-Patienten und Kontrollen mittels PAS-Färbung, IHC oder PCR auf die Präsenz der Pathogene untersucht. Die Zusammensetzung der Studienkohorte ist in Abbildung 5 dargestellt. 18 Patienten mit unspezifischen gastrointestinalen oder rheumatologischen Symptomen ohne positives Testergebnis aus duodenalen Biopsien stellten die Kontrollgruppe der Studienkohorte dar. Die Gruppe der MW-Patienten umfasste 20 Patienten, die die obengenannten Kriterien des MW erfüllten. Diese Patienten wurden je nach Behandlungszustand in die Subgruppen „unbehandelt“ (ohne Therapie), „anbehandelt“ (Therapie \leq 14 Tage) oder „behandelt“ (> 14 Tage nach Behandlungsbeginn) unterteilt. Vereinzelt Patienten wurden Lymphknoten, Haut- oder

Kolonbiopsien, Herzklappen, Synovial- oder Glaskörperflüssigkeit sowie Knochenmark entnommen (für detaillierte Informationen siehe Tabelle 27). 6 MW-Patienten (30%) wiesen die typischen klinischen Symptome und die charakteristischen PAS⁺ Mφ in der duodenalen Lamina propria auf, sodass diese als klassische MW-Patienten klassifiziert wurden. Bei einem weiteren Patienten wurden atypische PAS⁺ Mφ in der Submukosa detektiert (Patient 14, Tabelle 27). Zwei Patienten (Patient 12 und 17, Tabelle 27) wiesen eine *T. whipplei* induzierte Endokarditis auf, welche anhand einer entnommenen Herzklappe diagnostiziert wurde. Von diesen Patienten lagen keine Duodenalbiopsien zur PAS und IHC Diagnostik vor.

Alle MW-Patienten und Kontrollen haben schriftlich ihr Einverständnis zur Prozessierung und Lagerung ihrer biologischen Proben sowie der Weiterverarbeitung ihrer personenbezogenen Daten gegeben. Die Ethikkommission des Landes Berlin hat dem Forschungsvorhaben zugestimmt (Eudra-CT 2008-003951-54).

Tabelle 15: Analysiertes Probenmaterial.

Die Altersangabe bezieht sich auf das Alter zum Zeitpunkt der MW-Diagnosestellung. ¹: unbehandelte Patienten; ²: anbehandelte Patienten ≤ 14 Tage; ³: behandelte Patienten > 14 Tage.

Experiment	Material	MW-Patienten			Kontrollen		
		Anzahl	Geschlecht [w/m]	Alter [Jahre]	Anzahl	Geschlecht [w/m]	Alter [Jahre]
T-Lymphozyten-Reaktivität gegen Hsp70 und GrpE Proteine	PBMC (gefroren)	21 ³	7/14	59,0 (45-73)	27	12/15	43,0 (22-88)
T-Lymphozyten-Reaktivität bei optimierter Präsentation von GrpE Antigenen	Heparin-Blut	8 ³	1/7	62,0 (52-77)	7	4/3	33,4 (25-47)
Phänotypische Analyse und Zytokinproduktion	Heparin-Blut	8 ³	2/6	56,1 (24-76)	15	11/4	34,1 (25-58)
Mikroarray basierte Transkriptomanalyse	Heparin-Blut	2 ³	0/2	58,0 (48-68)	2	0/2	60,5 (59-62)
Untersuchungen zur systemischen Verbreitung mittels <i>rpoB</i> RT-PCR	Duodenal-Biopsien	18 (16 ¹ , 2 ²)	9/9	58,3 (36-79)	18	9/9	54,4 (25-79)
	Liquor	15 (13 ¹ , 2 ²)	7/8	55,5 (36-79)	5	3/2	55,0 (46-63)
	EDTA Blut	17 (14 ¹ , 3 ²)	8/9	59,5 (37-79)	7	4/3	58,3 (46-63)
	Heparin-Blut	19 (15 ¹ , 4 ²)	8/11	58,1 (36-79)	18	9/9	54,4 (25-79)

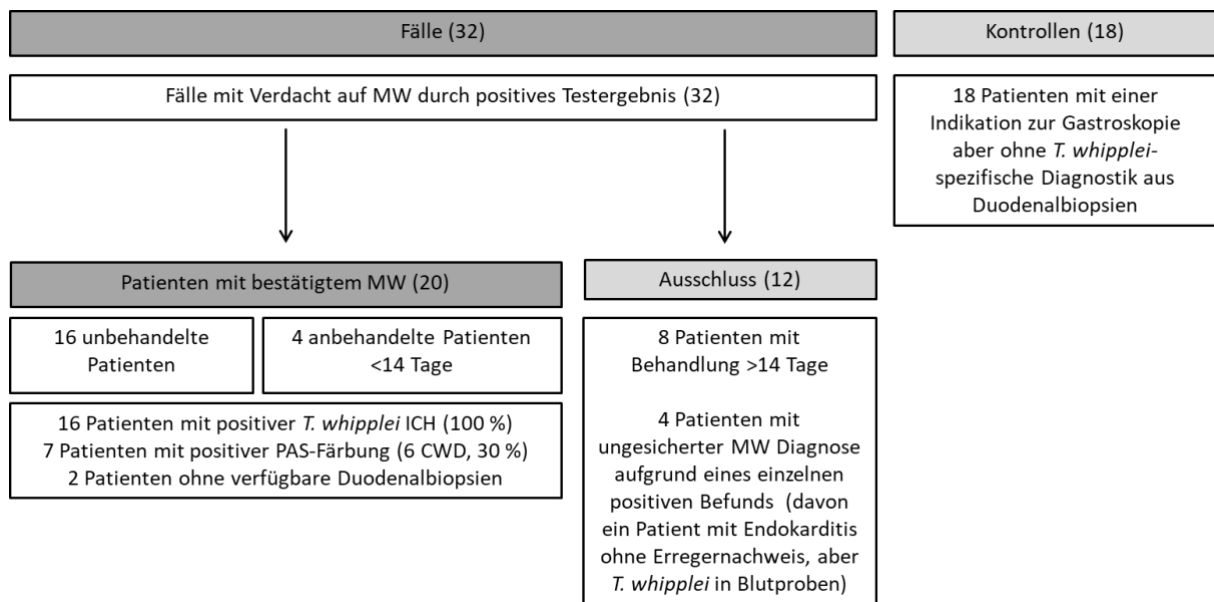


Abbildung 5: Detaillierte Zusammensetzung der Studienkohorte.

In die prospektive Pilotstudie wurden 32 Patienten mit mindestens einem positiven MW-Testergebnis und 18 Kontrollen eingeschlossen. 12 Patienten wurden aufgrund einer ungesicherten Diagnose oder einer vorhergehenden Behandlung von mehr als 14 Tagen ausgeschlossen. Von den 20 bestätigten MW-Patienten waren 16 Patienten therapienaiv und 4 Patienten wurden zuvor für <14 Tage unbehandelt. Nachgedruckt und übersetzt mit Genehmigung von Molecular Diagnosis & Therapy [175].

2.5 Software

Tabelle 16: Software.

Software	Hersteller oder Link
Expander 7	http://www.cs.tau.ac.il/%7Ershamir/expander/expander.html
Flow 8.8.4	TreeStar, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad, San Diego, CA, USA
LEGENDplex™ data analysis software	Biolegend, Fell, DE

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Anzucht von *Mycobacterium bovis* BCG

Die verwendeten *M. bovis* BCG Kulturen wurden von der Arbeitsgruppe A. Lewin, Fachgebiet 16, des Robert Koch Instituts, Berlin, zur Verfügung gestellt. *M. bovis* BCG wurde in Middlebrook 7H9 Flüssigmedium mit 10 % ADC und 0,05 % Tween 80 kultiviert. Zum Ansatz einer Vorkultur wurden 10 ml Medium mit einer *M. bovis* Kolonie angeimpft und für 10 bis 12 Tage im Brutschrank bei 37°C ohne CO₂ inkubiert. Die Vorkultur diente dem Ansatz einer Hauptkultur, welche im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) von 2,0 inkubiert wurde (siehe Kapitel 2.6.5). Die Bakterienkultur wurde à 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung in den Infektionsexperimenten (siehe Kapitel 2.7.11) bei -80°C gelagert.

2.6.2 Kultivierung von *T. whipplei* Bakterien

Es wurde der aus der Herzklappe eines MW-Patienten mit Endokarditis isolierte *T. whipplei*-Stamm Twist-Marseille™ verwendet [8, 9]. Die Kultivierung erfolgte in axenischem Medium nach Renesto *et al.* [15] in stehenden T75 Zellkulturflaschen in einem Maximalvolumen von 20 ml DMEM-Medium bei 37°C und 5 % CO₂. Unter diesen Bedingungen repliziert *T. whipplei* ca. alle 28 Stunden [15]. Ausgehend von dieser Bakterienkultur wurden wöchentlich Kulturen im Verhältnis von 1:10 mit frischem DMEM-Medium angesetzt. Um Kontaminationen der Kulturen auszuschließen, wurden in regelmäßigen Abständen Ausstriche auf Blutagarplatten durchgeführt. Für die Infektion von Monozyten (siehe Kapitel 2.7.11) wurden 5-7 Tage kultivierte *T. whipplei* Kulturen verwendet, welche eine OD₆₀₀ = 0,2 aufwiesen.

2.6.3 Konservierung von *T. whipplei* Bakterien

Für die Konservierung der *T. whipplei* Bakterien wurde eine Bakterienkultur für 15 min bei 2500 xg und 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in DMEM-Kulturmedium mit 20% Glycerol resuspendiert und à 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Langzeitlagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C. Zur Revitalisierung der Bakterien wurden die Aliquots bei Raumtemperatur aufgetaut und vor ihrer Verwendung gut durchmischt.

2.6.4 Herstellung von *T. whipplei* Lysat

Zur Herstellung von *T. whipplei*-Lysat wurde eine frische *T. whipplei* Twist-Marseille™ Kultur durch einstündiges Erhitzen bei 90°C im Wasserbad inaktiviert und zur Lyse der Bakterien anschließend dreimal für je eine Minute im Ultraschallbad mechanisch aufgeschlossen. Das inaktivierte Bakterienlysat wurde bis zur Verwendung in Aliquots à 1x10⁹/ml bei -80°C gelagert.

2.6.5 Optische Dichtebestimmung

Die Bestimmung der OD₆₀₀ diente der Beurteilung des bakteriellen Wachstums. Hierzu wurde 1 ml Bakterienkultur in eine Einmalküvette transferiert und am Spektralphotometer gegen reines Bakterienmedium als Leerwert gemessen.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter Verwendung steriler Reagenzien und Arbeitsmaterialien unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Zellkultivierung in R10-Kulturmedium mit 10 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS) in einem Begasungsbrutschrank mit einer Temperatur von 37°C und einer Luftfeuchte von 5 % CO₂. Zur Inaktivierung des Komplements wurde das FKS für eine Stunde bei 56°C inkubiert und bis zu seiner Verwendung bei -20°C gelagert. Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht explizit benannt, für 7 min bei 650 xg und 4°C in einer Kühlzentrifuge durchgeführt.

2.7.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl und -vitalität erfolgte durch Anfärbung der Zellen mit Trypanblau. Trypanblau ist ein nicht membrangängiger Farbstoff, der tote Zellen aufgrund ihrer defekten Membranstruktur blau färbt, während membranintakte, lebende Zellen ungefärbt erscheinen. Für die Berechnung der Lebendzellzahl wurden 10 µl Zellsuspension dichteabhängig 1:5 oder 1:10 mit einer 2 %-igen Trypanblau-Lösung verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden in eine Zählkammer überführt und vier Großquadrate ausgezählt.

Die Berechnung der Zellzahl/ml erfolgte nach Multiplikation des Mittelwerts der ausgezählten Zellen in vier Quadraten mit dem Kammerfaktor 1×10^4 und dem Verdünnungsfaktor (VF).

$$\text{Zellzahl/ml Suspension} = [(Q1+Q2+Q3+Q4)/4] \times VF \times 10^4$$

2.7.3 Konservierung und Reaktivierung humaner Zellen

Die Konservierung gewonnener Zellen erfolgte in einer Konzentration von 5×10^6 bis 1×10^7 /ml in Einfriermedium. Das verwendete Dimethylsulfoxid (DMSO) verhinderte eine Kristallbildung und daraus resultierende Zellschäden. Die Zellsuspension wurde à 1 ml in Kryoröhrchen pipettiert und in einem isopropanolgefüllten Gefrierbehälter bei -80°C gelagert, um eine kontinuierliche Kühlung um $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ auf -80°C zu gewährleisten. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen nach ihrer vollständigen Durchfrierung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Reaktivierung gefrorener Zellen erfolgte durch ein schnelles, schonendes Auftauen im Wasserbad bei 37°C . Nach Antauen des Mediums wurde die Zellsuspension in 40 ml kaltes Kulturmedium überführt und zentrifugiert. Um das zelltoxische DMSO zu entfernen, wurde das Zellpellet zweifach mit Kulturmedium gewaschen. Nach erfolgter Resuspension des Pellets wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.7.2) und die Suspension entsprechend dem experimentellen Ansatz in Kulturmedium auf die benötigte Zellzahl eingestellt. Die Aussaat erfolgte je nach Verwendungszweck in T75 Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten.

2.7.4 Vollblutstimulation

Um das Aktivierungspotential der T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden Vollblutstimulationen mit Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) durchgeführt. SEB ist ein Superantigen, welches unabhängig von seiner Prozessierung eine polyklonale Aktivierung der T-Lymphozyten induziert, indem es die MHC-Klasse-II-Moleküle mit den T-Lymphozyten-Rezeptoren verbindet. Für die Stimulationen wurde 0,5 ml frisches Heparinblut in sterilen 15 ml Reaktionsgefäßen für 6 Stunden in Anwesenheit von anti-CD28 und anti-CD49 mit SEB inkubiert. Zur intrazellulären Akkumulation der induzierten Zytokine wurde dem Stimulationsansatz für die letzten 3 Stunden $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A zugesetzt, wobei Brefeldin A die Exozytose von Proteinen reversibel blockiert und somit eine Anreicherung intrazellulärer Zytokine gewährleistet [176]. Nach Abschluss der Stimulation wurde das Blut mit einer Endkonzentration von 2 mM Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat (EDTA) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die adhärenenten Zellen von der Innenwand der Reaktionsgefäße zu lösen. Durch eine anschließende 15 min Inkubation mit 4,5 ml Lysepuffer wurden die Erythrozyten der Suspension lysiert und leicht anfixiert. Die Lösung wurde durch Zentrifugation entfernt und das entstehende Zellpellet für die analytische Durchflusszytometrie prozessiert (siehe Kapitel 2.8).

2.7.5 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurden mithilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation von den weiteren Blutbestandteilen separiert. Hierzu wurde Heparinblut in Vacutainer Röhrchen entnommen, bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 24 Stunden prozessiert.

Vorbereitend wurden 15 ml *Ficoll Paque™ Plus* in einem konischen 50 ml *Leucosep™*-Röhrchen durch Zentrifugation unter die Trennschleibe gebracht. Anschließend erfolgte die Schichtung von 15-30 ml unverdünntem Heparinblut auf die Trennschleibe und die Auftrennung der Bestandteile durch 10-minütige Zentrifugation bei $2100 \times g$ bei Raumtemperatur ohne Bremse. Die Ficoll-Dichte ($1,077 \pm 0,001 \text{ g}/\text{ml}$) bedingte, dass Erythrozyten und Granulozyten im Zuge der Zentrifugation durch die

Ficollschicht migrierten, während sich die mononukleären Zellen in einer Interphase ansammelten. Die sich über der Interphase bildende Schicht setzte sich aus dem Blutplasma und den Thrombozyten zusammen. Zur PBMC-Isolierung (Monozyten, B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen) wurde die Interphase vollständig abgenommen, in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 20-30 ml PBS/BSA gewaschen. Zur Entfernung verbliebener Erythrozyten wurde eine 5-minütige Erylyse der PBMC bei Raumtemperatur in 5 ml Erythrozytenlysepuffer durchgeführt. Die gewonnenen Zellen wurden im 10-fachen Volumen PBS/BSA erneut gewaschen, gezählt (siehe Kapitel 2.7.2) und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

2.7.6 Stimulationsversuche mit PBMC

Zur Durchführung von PBMC-Stimulationen wurden konservierte Zellen aufgetaut (siehe Kapitel 2.7.3) und in reduziertem Zellkulturmedium mit 5 % FKS auf eine Zellzahl von 3×10^6 PBMC/ml eingestellt. Die Stimulation erfolgte unter Zugabe von 2 µg/ml anti-CD28 für 12 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂. Es wurden je Ansatz 500 µl Zellsuspension in 48-Loch Kulturplatten überführt und diese mit den in Kapitel 2.3.6.1 beschriebenen Stimulanzen versetzt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Für die letzten 3 Stunden der Inkubation wurde den Stimulationsansätzen 10 µg/ml Brefeldin A zugegeben, wodurch sich die intrazellulären Zytokine akkumulierten [176]. Nach erfolgter Inkubation wurde die Zellsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert. Die Bestimmung von Oberflächen- und intrazellulären Markern erfolgte entsprechend Kapitel 2.8. Als Readout der Stimulationsversuche wurde die spezifische IFN-γ Expression analysiert. Die angewendete Gatingstrategie ist in Abbildung 6 dargestellt.

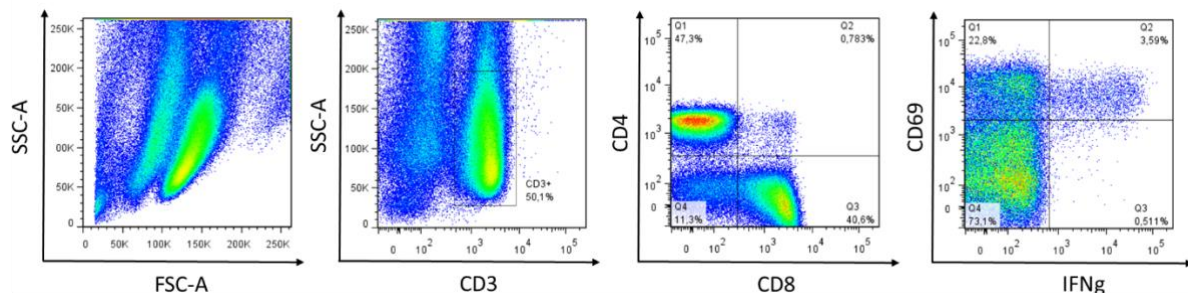


Abbildung 6: Gatingstrategie zur Analyse der spezifischen IFN-γ-Expression.

Zur Analyse der spezifischen IFN-γ Produktion wurde auf die T-Helferzellen (CD4⁺) und zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8⁺) innerhalb der CD3⁺ Lymphozyten gated. Die spezifische IFN-γ Produktion der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten wurde gegen den Aktivierungsmarker CD69 aufgetragen. Dargestellt ist die Induktion der IFN-γ Produktion der CD4⁺ T-Lymphozyten eines MW-Patienten durch SEB.

2.7.7 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mittels Elektroporation

Das Einbringen von Fremdnukleinsäuren in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Im Zuge dieser Arbeit wurde Form der Elektroporation nach Stroh *et al.* angewendet [172]. Die Elektroporation beschreibt den Prozess der Einschleusung genetischen Materials, z.B Plasmid-DNA, durch einen elektrischen Impuls. Hierbei wird das Membranpotential der Zelle kurzfristig zerstört und es kommt zur Ausbildung von Poren, durch welche das genetische Material in das Zytoplasma der Zellen eindringen kann. Für die Elektroporation wurden frisch isolierte PBMC (siehe Kapitel 2.7.5) auf 3×10^6 Zellen/ml in Kulturmedium eingestellt, in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen durch Zentrifugation pelletiert und anschließend auf Eis gelagert. Der Überstand wurde gründlich abgenommen und die pelletierten Zellen in 100 µl Elektroporationspuffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 2 µg p86-Plasmid und 4 µg pGrpE-Plasmid wurde die Suspension in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm

Spaltbreite transferiert. Die Aufhebung des Membranpotentials erfolgte durch die Kombination eines High Voltage (HV) Pulses von 900 V für 400 μ s und eines Low Voltage (LV) Pulses von 150 V für 3 ms. Unmittelbar nach der Transfektion wurden die Zellen in 4 ml vorgewärmtes Kulturmedium in 6-Loch Kulturplatten überführt und im Brutschrank kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde die Transfektionseffizienz bestimmt. Hierzu wurden 0,5 ml Zellsuspension entnommen und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD3 und CD86 sowie aufgrund der GFP-Kassette im pGrpE-Plasmid auf die Autofluoreszenz im FITC-Kanal untersucht. Die Gatingstrategie zur Ermittlung der Transfektionseffizienz ist in Abbildung 7 dargestellt.

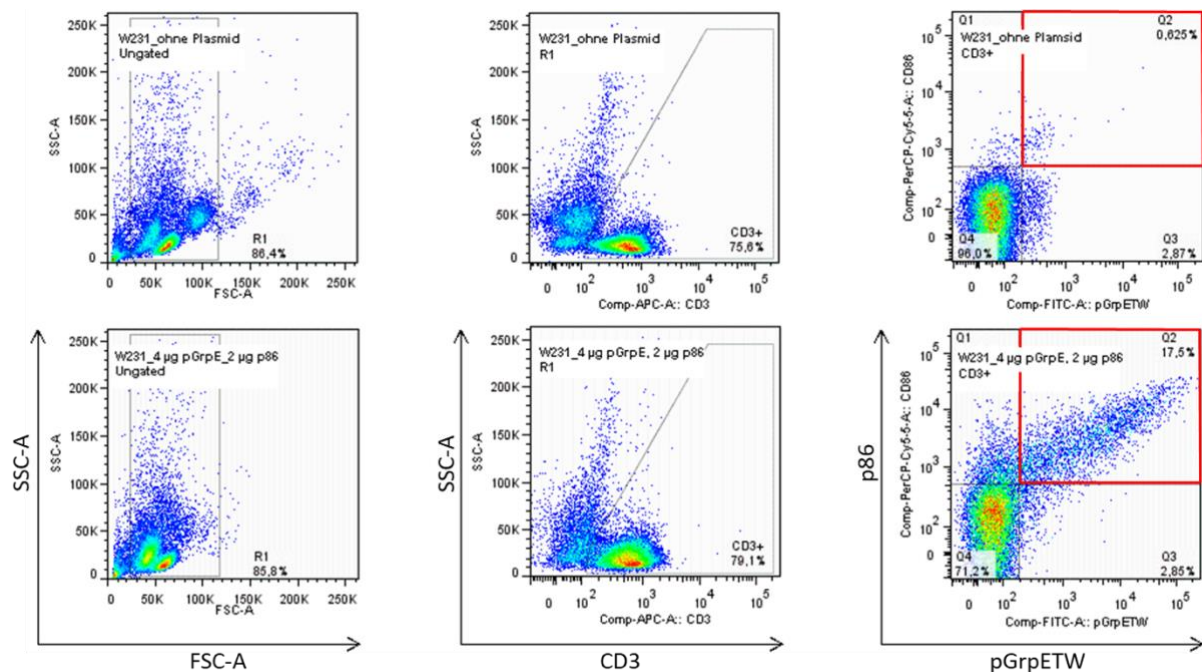


Abbildung 7: Gatingstrategie zur Analyse der Plasmid-Integrität von p86 und pGrpE.

PBMC exprimierten 24 Stunden nach Transfektion auf ihrer Oberfläche CD86 und wiesen bei Integration des pGrpE-Plasmids aufgrund der inserierten GFP-Kassette eine Fluoreszenz im FITC-Kanal auf. Dargestellt ist Gatingstrategie zur Analyse der Transfektionseffizienz eines MW-Patienten nach Transfektion ohne Plasmid (**oben**) sowie nach Transfektion mit 4 µg pGrpETW und 2 µg p86 (**unten**). Doppeltpositive Zellen (rotes Quadrat) wurden erfolgreich mit p86 und pGrpETW transfiziert.

2.7.8 Analyse der T-Lymphozyten-Reaktivität gegen transfizierte PBMC

24 Stunden nach erfolgter Transfektion (Kapitel 2.7.7) wurden die transfizierten Zellen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 7 min bei 1400 rpm und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde nach Entfernung des Überstands in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Lebendzellzahl entsprechend Kapitel 2.7.2 bestimmt. Die transfizierten PBMC wurden in Zellkulturmedium auf 5×10^5 /ml eingestellt und gemeinsam mit 5×10^4 nicht transfizierten PBMC desselben Donors in je eine Kavität einer 48-Loch Kulturplatte überführt. Als Negativkontrolle wurde die Aktivierung nicht transfizierter PBMC untersucht. Als Positivkontrolle diente die Stimulation nicht transfizierter PBMC mit PMA/Ionomycin. Alle Ansätze wurden im Triplikat durchgeführt. Nach einer 24-stündigen Inkubation des Ansatzes bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Analyse der T-Lymphozyten-Reaktivität gegen die transfizierten, prozessierten GrpE-Antigene. Hierzu wurde dem Zellkulturansatz für 3 Stunden Brefeldin A zugegeben und anschließend eine Färbung gegen CD3, CD8, Granulysin, Granzym B, Perforin und INF- γ , wie in Kapitel 2.8 beschrieben, durchgeführt.

2.7.9 Magnetische Isolation von CD14⁺ Monozyten

Monozyten wurden mittels magnetischem Zellsortierungssystem (MACS, *magnetic-activated cell sorting*) aus aufgereinigten PBMC (siehe Kapitel 2.7.5) gewonnen [177]. Das System beruht auf einer magnetischen Zellseparation durch monoklonale Antikörper, die gegen zellspezifische Oberflächenantigene gerichtet und an paramagnetische Mikropartikel (MicroBeads) gekoppelt sind. Die Auftrennung der Zellen erfolgt über Trennsäulen mit ferromagnetischer Stahlwolle, welche in einen Permanentmagneten platziert w. Magnetisch markierte Zellen, welche das entsprechende Antigen exprimieren, werden in der Säule zurückgehalten, während nicht markierte Zellen die Trennsäule passieren. Nach Entfernung der Säule aus dem Magneten werden die zurückgehaltenen Zielzellen eluiert und für den experimentellen Einsatz verwendet.

Im Zuge dieser Arbeit erfolge die Aufreinigung von Monozyten mithilfe eines konjugierten CD14-Antikörpers, einem LPS Rezeptor, nach Herstellerangaben über eine LS-Säule. Die CD14⁺ markierten Zellen wurden in 3 ml Zellkulturmedium eluiert und mit 10 ml Kulturmedium gewaschen. Nach Entfernung des Überstands und Resuspension des Pellets in frischem Zellkulturmedium erfolgte die Reinheits- (siehe Kapitel 2.7.10) und Vitalitätsbestimmung isolierter CD14⁺-Monozyten (siehe Kapitel 2.7.2).

2.7.10 Reinheitsbestimmung isolierter Monozyten

Zur Reinheitsbestimmung der gewonnenen CD14⁺-Monozyten (siehe Kapitel 2.7.9) wurden 20 µl der eluierten Zellsuspension entnommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet in 50 µl Antikörperlösung resuspendiert, die den in PBA verdünnten Antikörper gegen CD14 sowie 2 % (v/v) Beriglobin zur Vermeidung unspezifischer Bindungen an den Fc-Rezeptor enthielt. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C. Nach einem Waschschrift mit 1 ml PBA wurde die CD14 Expression durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.8).

2.7.11 Infektion von CD14⁺ Monozyten in Suspension

Zur Untersuchung des Einflusses intrazellulärer *T. whipplei* Bakterien auf die Polarisierung *in vitro* differenzierter Mφ wurden Monozyten mit vitalen *T. whipplei* Bakterien oder dem Kontrollbakterium *M. bovis* BCG infiziert. Hierzu wurden frisch isolierte CD14⁺ Monozyten (siehe Kapitel 2.7.9) auf eine Zellzahl von 5x10⁵/ml in Kulturmedium eingestellt und mit 10 µl/ml einer 5-7 Tage kultivierten *T. whipplei* Kultur oder 1 µl/ml *M. bovis* BCG versetzt. Die Zellsuspension wurde gut durchmischt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung nicht internalisierter Bakterien erfolgte eine dreimalige Waschung mit PBS/BSA und die *in vitro* Differenzierung zu Mφ (siehe Kapitel 2.7.12).

2.7.12 Generierung *in vitro* differenzierter Mφ

In vitro differenzierte Mφ wurden aus frisch isolierten CD14⁺ Monozyten (siehe Kapitel 2.7.9) generiert. 5x10⁵ Monozyten/ml wurden in Kulturmedium aufgenommen und je nach experimentellem Ansatz à 1 ml Zellsuspension in 12-Loch oder à 2 ml in 6-Loch Kulturplatten überführt. Zur Generierung klassisch aktivierter Mφ1 wurde dem Kulturmedium alle 2-3 Tage der Wachstumsfaktor GM-CSF, für die Generierung alternativ aktivierter Mφ2 der Wachstumsfaktor M-CSF frisch zugesetzt. Nach 7 Tagen der Polarisierung waren die *in vitro* differenzierten Mφ ausgereift und wurden für weitere Experimente verwendet.

2.7.13 Ablösung *in vitro* differenzierter Mφ

Vor der Ablösung *in vitro* differenzierter Mφ aus den Zellkulturplatten wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und bis zur Messung der Zytokinkonzentration bei -20°C gelagert (siehe Kapitel 2.11). Die adhärenen Zellen wurden nach Zugabe von 0,5 ml 10 mM EDTA für 20 min bei 37°C, 5 % CO₂

inkubiert. Die durch den vorsichtigen Einsatz eines Zellscrapers erhaltene Zellsuspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellkulturplatte anschließend dreimal mit je 1 ml Zellkulturmedium gespült, um möglichst alle abgelösten Zellen zu gewinnen. Nach erfolgter Zentrifugation wurde das Pellet in Zellkulturmedium resuspendiert und die Lebendzellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.7.2). Die gewonnenen Mφ wurden entweder zur Analyse von Zytokinen auf die intrazelluläre Replikation (siehe Kapitel 2.7.14) oder für die phänotypische Charakterisierung mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.8) verwendet.

2.7.14 Beeinflussung der intrazellulären *T. whipplei* Replikation durch Zytokine

Zur Analyse des Einflusses von Zytokinen auf die intrazelluläre *T. whipplei* Proliferation wurden differenzierte Mφ an Tag 7 ihrer Polarisierung vom Plattenboden gelöst (siehe Kapitel 2.7.13), die Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 2.7.2) und die Mφ à 2×10^5 /ml in Kulturmedium für die Generierung von Mφ1 bzw. Mφ2 in 24-Loch Kulturplatten neu ausgesät. An Tag 8 der Differenzierung wurde den Mφ entsprechend dem Protokoll von Ferland *et al.* [178] das zu untersuchende Zytokin zugeführt. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit *T. whipplei*. Hierzu wurde der Überstand der adhärenen Mφ entfernt und 1 ml Kulturmedium, versetzt mit 50 µl/ml *T. whipplei* Bakterienkultur, zugegeben. Zur Herstellung eines physiologischen Zellkontakts wurde der Ansatz bei 400xg und 4°C zentrifugiert. Es folgte eine Inkubation für 4 Stunden bei 37°C. Nicht internalisierte Bakterien wurden durch dreimaliges Waschen mit vorgewärmtem Kulturmedium entfernt, bevor die Zellen für weitere 7 Tage unter täglicher Zugabe des Zytokins bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert wurden. Die Wachstumsfaktoren GM-CSF und M-CSF wurden alle 2-3 Tage frisch zugegeben. Die Morphologie der Mφ wurde im Verlauf des Experiments durch Fotoaufnahmen am Mikroskop Zenlite visualisiert. Zum Zeitpunkt der Probenahme wurden die Mφ zweimalig mit Zellkulturmedium gewaschen und anschließend durch Zugabe von 300 µl RLT-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in Kryoröhrchen überführt und bis zur Extraktion der Nukleinsäuren bei -80°C gelagert (siehe Kapitel 2.9.1).

2.7.15 Einfluss von *T. whipplei* auf den Phänotyp *in vitro* differenzierter Mφ

Um den Einfluss von *T. whipplei* und des Kontrollbakteriums *M. bovis* BCG auf die *in vitro* Differenzierung von Mφ zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener Differenzierungsmarker an Tag 14 und Tag 21 nach erfolgter Infektion (siehe Kapitel 2.7.11) phänotypisch charakterisiert. Die Kultivierung erfolgte bei kontinuierlicher Gabe der Wachstumsfaktoren von GM-CSF für die Generierung von Mφ1 bzw. M-CSF für Mφ2. An Tag 10 der Differenzierung wurde ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt, um die Mφ mit frischen Nährstoffen zu versorgen. Am Tag der Probenahme wurden die adhärenen Mφ für 3 Stunden in Zellkulturmedium mit 10 µg/ml Brefeldin A inkubiert, wodurch eine Anreicherung der intrazellulären Zytokine erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen aus den Kulturplatten (siehe Kapitel 2.7.13) und deren durchflusszytometrische Analyse (siehe Kapitel 2.8). Die im Zuge der phänotypischen Charakterisierung gewonnenen Zellüberstände wurden unverdünnt in 1 ml Kryoröhrchen überführt und für die spätere Messung der Zytokinkonzentrationen bei -20°C gelagert (siehe Kapitel 2.11).

2.8 Analytische Durchflusszytometrie

Die analytische Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting, FACS*) ermöglicht die Analyse physikalischer und molekularer Eigenschaften von Einzelzellen in einer Suspension. Dabei liefert sie neben einer qualitativen Aussage (Prozent positiver und negativer Zellen) auch eine quantitative Bestimmung (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) der Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Die Suspensionszellen werden vereinzelt in einem Flüssigkeitsstrahl an

einem Laserstrahl vorbeigeführt, wobei das monochromatische Licht des Argon-Lasers entsprechend den morphologischen Eigenschaften gestreut und über Detektoren erfasst wird. Das Vorwärtstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) gibt Auskunft über die Größe der Zelle, während das im 90° Winkel einfallende Seitwärtstreulicht (*Sideward Scatter*, SSC) die Granularität der Zelle detektiert. Die Auftragung von FSC gegen SSC ermöglicht somit die Unterscheidung verschiedener Zelltypen, wie beispielsweise Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten in einer heterogenen Zellpopulation. Eine detailliertere Klassifizierung der Suspensionszellen wird durch eine fluoreszenzvermittelte Analyse erreicht, bei welcher zelluläre Strukturen mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gekoppelt und über verschiedene Filter analysiert werden. Hierbei emittieren die Fluorochrome nach Anregung durch den Laserstrahl Licht in bestimmten Wellenlängen, welches sich je Fluorochrom in seinen Absorptions- und Emissionsmaxima unterscheidet. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Fluorochromen ist es möglich, mehrere Parameter einer Zelle zeitgleich zu analysieren.

Zur Autofluoreszenzbestimmung wurde stets eine Suspension unmarkierter Zellen mitgeführt. Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten am FACS Calibur (vier Farben) oder dem FACS Canto II (acht Farben). Die anschließende Datenanalyse erfolgte mit dem Auswertungsprogramm FlowJo.

Tabelle 17: Anregungs- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome.

FITC: Fluoresceinisothiocyanat; PE: Phycoerythrin; APC: Allophycocyanin; Cy: Cyanin; PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein; nm: Nanometer

Fluorochrom	Absorptions-maximum [nm]	Emissions-maximum [nm]	Farbe des emittierten Lichts
Alexa Fluor 647	650	668	Rot
APC	650	660	Rot
APC Vio770	652	775	Rot
APC-H7	650	785	Infrarot
FITC	494	520	Grün
Pacific Blue	401	452	Blau
PE	496, 546	578	Gelb
PE-Cy7	488-561	775	Infrarot
PerCP	482	678	Rot
PerCP-Cy5.5	482	695	Rot
VioBlue	400	452	Violett

2.8.1 Färbung von Oberflächenantigenen

Zur Charakterisierung von Oberflächenantigenen wurden vitale Zellen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen zentrifugiert und nach Abnahme des Überstands für 15 min bei 4°C mit 50 µl fluoreszenzmarkierten Antikörpern sowie 2 % (v/v) Beriglobin zur Vermeidung unspezifischer Bindungen inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper erfolgte nach Zugabe von 1 ml PBS/BSA eine 10-minütige Zentrifugation bei 650xg und 4°C. Die pelletierten Zellen wurden zur durchflusszytometrischen Analyse in 200 µl PBA aufgenommen oder vorbereitend auf die Färbung intrazellulärer Proteine fixiert (siehe Kapitel 2.8.2).

2.8.2 Fixierung von Zellen

Die Fixierung der Zelle ist eine essenzielle Voraussetzung für die sich anschließende Permeabilisierung, da sie durch eine Vernetzung der Zellproteine die Zellintegrität stärkt und somit die Zellstruktur während der Perforation erhält.

Zur Fixierung von Suspensionszellen wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 100 µl 4 % PFA-Lösung resuspendiert, für 10 min bei 37°C fixiert und anschließend zur Entfernung des überschüssigen Paraformaldehyds mit 1 ml PBA gewaschen. Die fixierten Zellen wurden bei 4000 xg für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung und Färbung intrazellulärer Proteine (siehe Kapitel 2.8.3).

2.8.3 Färbung intrazellulärer Proteine

Um intrazellulär angereicherte Zytokine wie Interferon-γ zu detektieren, wurde die Zellmembran durch das pflanzliche Detergenz Saponin reversibel permeabilisiert und der Zugang fluorochrom-gekoppelter Antikörper in Richtung Antigen ermöglicht. Dazu wurden die fixierten Zellen (siehe Kapitel 2.8.2) in 50 µl PBA-Lösung mit 2 % (v/v) Beriglobin und 0,5 % (w/v) Saponin sowie den gelösten Antikörpern resuspendiert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen gewaschen und final in 200 µl PBA aufgenommen.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Nukleinsäure-Extraktionen

Zum Nachweis von *T. whipplei* in EDTA Blut, PBMC oder angereicherten Blutfraktionen wurde eine DNA-Extraktion mittels AMPLICOR Respiratory Specimen Preparation Kit nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei das doppelte Volumen der Respiratory Specimen Wash Solution für die Waschschrte verwendet wurde. Die aus EDTA-Proben gewonnene DNA wurde durch das QIAamp DNA Blood Mini Kit aufgereinigt, um mögliche PCR-Inhibitoren zu entfernen.

Die Extraktion der in den Transkriptomanalysen untersuchten RNA erfolgte mittels RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Für die kombinierte Extraktion von DNA und RNA aus einer Probe wurde das säulenbasierte AllPrep DNA/RNA Mini Kit verwendet. In Ergänzung zum Protokoll wurde ein 15-minütiger DNase-Verdau nach Herstellerangaben des RNase-Free DNase Sets direkt auf der Silikamembran durchgeführt. Die Elution von RNA erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser, während die DNA-Elution in 100 µl Elutionspuffer erfolgte.

2.9.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Bestimmung der DNA und RNA Konzentration erfolgte mithilfe des NanoDrop 1000. Anhand der Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm und 280 nm wurde die Nukleinsäurekonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Faktor} \times A_{260}$$

Dabei entsprach der Faktor bei doppelsträngiger DNA 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA oder RNA 40 µg/ml. Mögliche Verunreinigungen von Proteinen wurden bei 280 nm detektiert, weshalb die Reinheit der Präparation aus dem Quotienten von A₂₆₀/A₂₈₀ ermittelt wurde. Qualitativ reine RNA weist nach Sambrook *et al.* einen Quotienten von 1,8 bis 2,0 auf [179].

2.9.3 Reverse Transkription

Der Prozess der reversen Transkription bezeichnet die Umschreibung von mRNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA). Diese wird durch eine spezifische RNA-abhängige DNA-Polymerase, die sogenannte Reverse Transkriptase, vermittelt [180].

Als Primer für die cDNA-Synthese wurden Random Hexamer Oligonukleotide, eine Mischung aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden, verwendet, welche sich komplementär an die RNA anlagerten und somit den Startpunkt der Reversen Transkriptase bildeten. Zur reversen Transkription wurden 10 µl DNase1 verdaute RNA mit 1 µl Random Hexamer Primern, 1 µl dNTPs und 1 µl Nuklease-freiem Wasser für 5 min bei 65°C inkubiert, um die RNA zu denaturieren, und danach für 1 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde die RNA durch die SuperScript™ III Reverse Transkriptase unter Zugabe von 7 µl des nachfolgenden Reaktionsansatzes in cDNA umgeschrieben (Gesamtvolumen 20 µl):

Tabelle 18: Reaktionsansatz der SuperScript™ III Reverse Transkriptase vermittelten cDNA Synthese.

Reagenzien	Konzentration	Reaktionsansatz (1x)
5x First-Strand Puffer		4 µl
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	200 U/µl	1 µl
DTT	0,1 M	1 µl
RNase OUT Inhibitor	40 U/µl	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 25°C inkubiert, um eine Anlagerung der Primer an die mRNA-Matrize zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Synthese der cDNA für 60 min bei 50°C, bevor das Enzym für 15 min bei 70°C inaktiviert und die Reaktion gestoppt wurde. Zur Vergleichbarkeit der RNA-Extraktion und cDNA Synthese wurde in jedem RT-PCR Lauf die aus 1 ml *T. whipplei* Kultur gewonnene cDNA mitgeführt.

2.9.4 Real-time PCR

Die sogenannte *real-time* PCR (RT-PCR) ermöglicht die Detektion akkumulierter PCR Produkte bereits während des Reaktionsprozesses. Diese „Echtzeit“ Bestimmung basiert auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, welches während der exponentiellen Phase der RT-PCR direkt proportional zum entstehenden Amplifikat ist [181].

Hierzu wurden die sequenzspezifischen Sonden TwrpoB-HP-1 und TwrpoB-HP-2 für das 109 bp Fragment des *rpoB* Gens von *T. whipplei* verwendet. Bei Anlagerung beider Sonden an den Matrizenstrang wurde die Fluoreszenz der TwrpoB-HP1 Sonde aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher nach dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) - Prinzip unterdrückt. Im Zuge der Amplifikation wurde die Sonde durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase hydrolytisch vom Quencher entfernt und die emittierte Fluoreszenz detektiert [182]. Nach erfolgter RT-PCR wurde die Anzahl der Zyklen in einem sogenannten Amplifikationsplot gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen und anhand der Hintergrundfluoreszenz ein Schwellenwert bestimmt. Der Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal diesen Schwellenwert erstmalig überschritt, wurde als *threshold cycle* oder CT-Wert bezeichnet. Am CT-Wert befand sich in allen Reaktionsansätzen die gleiche Menge neu synthetisierter (c)DNA. Entsprechend ermöglichte die CT-Wert Analyse eine Aussage über die Ausgangsmenge gesuchter (c)DNA in den analysierten Proben. Bei niedrigen CT-Werten befand sich eine höhere Anzahl der gesuchten Zielsequenz im Ausgangsmaterial als bei hohen CT-Werten.

Die RT-PCR erfolgte in einem LightCycler 2.0 von Roche Diagnostics. Der Reaktionsansatz ist Tabelle 19 und das entsprechende RT-PCR Programm Tabelle 20 zu entnehmen. Nach 40 Amplifikationszyklen wurde eine Schmelzkurve erstellt. Hierzu wurde das PCR-Produkt über eine kontinuierliche Temperaturerhöhung von 40°C auf 90°C aufgeschossen, um den Schmelzpunkt (T_m) zu bestimmen. Eine Probe wurde positiv auf *T. whipplei* getestet, wenn die Fluoreszenz der sequenzspezifischen Sonden das Hintergrundsignal überschreitet und der charakteristische T_m -Wert von 63°C sowie ein zweiphasiger Kurvenverlauf in der Schmelzkurvenanalyse beobachtet wurde [168].

Für den diagnostischen Nachweis von *T. whipplei* in humanen Proben diente extrahierte DNA als Ausgangsmaterial für die RT-PCR. Die Bestimmung der intrazellulären *T. whipplei* Replikation unter dem Einfluss verschiedener Zytokine hingegen erfolgte durch den Einsatz DNase1 verdauter, revers transkribierter cDNA.

Tabelle 19: Reaktionsansatz der *rpoB* RT-PCR.

Reagenzien	Konzentration	Reaktionsvolumen (20 µl)
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe		2 µl
MgCl ₂	25 mM	3,2 µl
TwrpoB-F4	5 pmol	1 µl
TwrpoB-R	10 pmol	1 µl
TwrpoB-HP1	4 nmol	1 µl
TwrpoB-HP2	4 nmol	1 µl
(c)DNA		5 µl
Aqua dest		Ad 20 µl

Tabelle 20: Reaktionsprogramm der *rpoB* RT-PCR.

Reaktionsschritt (40 Zyklen)	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	10 s
Primer-Annealing	55°C	20 s
DNA-Synthese	72°C	30 s
Kühlung	40°C	20 s
Schmelzkurve	90°C	0 s
Kühlung	40°C	30 s

2.10 Mikroarray basierte Transkriptomanalyse

Das Prinzip der Mikroarray-Technologie basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren auf der Oberfläche einer Festphase (Array). Hierbei bilden einzelsträngige immobilisierte Oligonukleotide mit markierten RNA Proben komplementäre Doppelstränge, die nachfolgend anhand ihrer Fluoreszenzintensität quantifiziert werden. Die Platzierung einer Vielzahl synthetisierter Oligonukleotide auf einem Array ermöglicht es, die Expression einer hohen Anzahl von Genen simultan

zu untersuchen und somit die transkriptionelle Aktivität einer Zelle in verschiedenen physiologischen Zuständen zu analysieren. Für die Transkriptomanalyse wurde die zu untersuchende RNA entsprechend Kapitel 2.9.1 isoliert und mittels RIN-Wert Analyse (siehe Kapitel 2.10.1) auf ihre Qualität geprüft. Die weitere Prozessierung der RNA und die Hybridisierung der Mikroarrays erfolgte durch die Firma Oaklabs, Hennigsdorf, Deutschland. Es wurden 16 Mikroarray Chips durchgeführt, in denen vier Zustände mit je 2 MW-Patienten und gesunden Kontrollen analysiert wurden.

2.10.1 Überprüfung der RNA-Integrität

Die Überprüfung der RNA-Integrität erfolgte unter Verwendung des 2100 Bioanalyzers. Hierbei wurden die 18S und 28S Fraktionen der rRNA, die mRNA sowie fragmentierte RNA durch eine chipbasierte Kapillar-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt und in Form eines Elektropherogramms visualisiert. Die Software des Bioanalyzers ermittelte das Verhältnis der ribosomalen Banden und berechnete über eine Standard RNA einen sogenannten RNA-Integritätswert (RIN-Wert, Rin^e , *RNA Integrity Number equivalent*) zwischen 1 und 10. Ein RIN-Wert von 10 indiziert eine intakte, nicht degradierte RNA sehr hoher Qualität, während vollständig degradierte RNA mit geringster Qualität einem RIN-Wert von 1 entsprach [183].

2.10.2 Amplifikation und Labeling

Das Low Input QuickAmp Labeling Kit wurde zur Generierung fluoreszierender komplementärer cRNA nach Herstellerangaben verwendet. Die Erststrangsynthese erfolgte unter Verwendung von Oligo-dT-Primern. Nach der Zweitstrangsynthese wurde eine *in vitro* Transkription zur Synthese Cyanine 3-CTP gelabelter cRNA durchgeführt.

2.10.3 Hybridisierung und Scannen des Mikroarrays

Die Hybridisierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben des Agilent Gene Expression Hybridisation Kits. Hierbei wurden 600 ng cRNA auf 8x60 K Mikroarrays hybridisiert. Anschließend wurden zwei Waschschrte mit Agilent Gene Expression Waschpuffer 1 und vorgewärmtem Agilent Gene Expression Waschpuffer 2 durchgeführt. Die Fluoreszenzsignale wurden durch den SureScan Microarray Scanner mit einer Auflösung von 5 Mikron detektiert.

2.10.4 Mikroarray Analyse

Die Expressionsdaten der singulären Chips wurden von der Firma Oaklabs, Hennigsdorf, Deutschland bereitgestellt. Die weiterführende Analyse erfolgte mit von Dr. Joachim R. Grün entwickelten Methoden. Hierbei wurden die erhaltenen Expressionsdaten simultan unter Verwendung des Programms Expander7 [184] logarithmiert und Quantil normalisiert. Anschließend erfolgte die Datenauswertung mithilfe von Access Datenbanken, in denen alle Werte analog zu den bereits veröffentlichten Publikationen von Affymetrix Chips verwendet wurden [185-187]. In jeder Datenbank wurden jeweils zwei gegen zwei Chipdatensätze nach der *High Performance Chip Data Analysis* (HPCDA) Methode ausgewertet, wie in Anhang 4 dargestellt. Kurzgefasst wurden mit der HPCDA folgende Abfragen durchgeführt: 1.) Ist die Identifikationsnummer (ID) bzw. das von der ID dargestellte Gen vom Agilent Algorithmus der Firma Oaklabs als Absent, d.h. nicht in ausreichender Menge in der Probe vorhanden, oder Present gekennzeichnet? 2.) Hat die ID einen bestimmten mittleren Wert in der Expressionssignalhöhe eines Chipdatensatzes erreicht? Von den ermittelten Present IDs wurden jene IDs als signifikant gefiltert, die einen HPCDA-Score von ≥ 100 , einen X-Wert des HPCDA-Volcano-Plots von ≥ 4 , oder einen Y-Wert von ≥ 5 erfüllten [188]. Hierbei mussten mindestens drei der vier IDs hoch (*increased*) oder herunterreguliert (*decreased*) vorliegen. Zusätzlich wurden mit einem Bonferroni korrigierten t-Test vier logarithmierte Fold Changes (*Signal Log Ratios*, SLRs) von

Experiment gegen Baseline Chips gegen zwei SLRs der Baseline Chips untereinander plus zwei SLRs der Experiment Chips auf Signifikanz getestet. Dieses Vorgehen entsprach der Analyse, ob der Fold Change von Experiment gegen Baseline signifikant unterschiedlich zu Null ist. IDs, die alle notwendigen Kriterien erfüllten, wurden in die Liste der signifikanten Gene übernommen und nach absteigenden HPCDA-Score gerankt. Um Gene zu filtern, von denen beide Expressionssignale einer Gruppe über oder unter den Werten der Vergleichsgruppe lagen, wurde eine weitere Reduktion der signifikanten Gene unter Anwendung des Programms Genes@Work durchgeführt [189]. Final erfolgte die Umschreibung der reduzierten signifikanten Agilent IDs mithilfe der Datenbank in Affymetrix IDs und deren Zuordnung zu funktionellen Gruppen durch das Webtool DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, [190]).

2.11 Zytokinquantifizierung mittels LEGENDplex™ Multi-Analyte Flow Assay Kit

Die Methode des *Cytometric Bead Array* (CBA) findet bei der quantitativen Analyse von Zytokinen und anderen löslichen Komponenten des Immunsystems Anwendung. Hierbei sind spezifische Capture-Antikörper an Mikropartikel, sogenannte *beads*, gebunden. Diese *beads* unterscheiden sich in ihrer Größe und ihrer Eigenfluoreszenz, wodurch eine simultane Quantifizierung mehrerer Analyte in einem Reaktionsansatz erreicht werden kann.

Im Zuge dieser Arbeit wurde das LEGENDplex™ Human Th1/Th2 Panel von BioLegend verwendet. Dieses 8-plex Panel ermöglichte die simultane Quantifizierung von IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 sowie INF- γ und TNF- α in einer Probe. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben in einer Filterplatte mit 96 Kavitäten, wodurch ein Analytverlust während der Waschschrte minimiert wurde. Die Filterplatte wurde primär äquilibriert und anschließend mit 25 μ l *Assay Buffer*, 25 μ l einer 1:4 Standardreihe oder der zu untersuchenden Probe sowie 25 μ l *beads* beladen. Die Suspension wurde bei 500 rpm lichtgeschützt für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Filterplatte zweimal mit je 200 μ l 1x Waschpuffer unter Verwendung einer Vakuumpumpe gewaschen, bevor 25 μ l *Detection Antibody* in die Kavitäten gegeben wurden. Nach einer einstündigen Inkubation der *Detection Antibodies* mit den *bead*-gekoppelten Analyten bei 500 rpm wurde die Detektionslösung mit 25 μ l Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) versetzt und für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Proben in 200 μ l Waschpuffer am FACS Calibur II. Die Zytokinkonzentrationen wurden anhand der mitgeführten Standardreihe mithilfe der BioLegend LEGENDplex™ Data Analysis Software ermittelt.

2.12 Histologische Methoden

2.12.1 Fixierung, Paraffineinbettung und Antigendemaskierung von Geweben

Vor der Durchführung immunhistochemischer Färbungen wurden die frisch entnommenen Duodenalbiopsien für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur in 4% PFA-Lösung fixiert. Anschließend erfolgte die sogenannte Einbettung der Proben am Institut für Pathologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Hierbei wurden die Gewebeproben in Einbettkassetten transferiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-100%) und Xylol entwässert und anschließend in verflüssigtes Paraffin überführt. Nach dem Auskühlen stand ein Paraffin-Block mit eingeschlossenem Gewebe zur Verfügung, von welchem mithilfe des Mikrotoms 4 μ m dünne Schnitte angefertigt wurden. Diese wurden für ihre optimale Ausdehnung kurz in vorgewärmtes Wasser überführt und auf Objektträger gezogen. Zur Entparaffinisierung wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten dreimal für je 5 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend für jeweils eine Minute in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-70%) rehydriert. Da es im Zuge der Formalin-Fixierung zu einer Veränderung der

antigenen Bildungsstellen kommen könnte, welche in einem partiellen oder vollständigen Verlust der Immunreaktivität resultieren würde, wurden die Gewebeschnitte nachfolgend durch 2- bis 5-minütiges Kochen in Citratpuffer (10 mM, pH 6) demaskiert. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und bis zur immunhistochemischen Färbung (siehe Kapitel 2.12.2) in TBS gelagert.

2.12.2 Immunhistochemische Färbungen

Mithilfe immunhistochemischer Färbungen werden Krankheitserreger wie Bakterien spezifisch in einem Gewebeschnitt nachgewiesen oder Zelltypen hinsichtlich ihrer Verteilung im Gewebe untersucht. Zudem lässt sich bestimmen, in welchem Gewebe ein gewisses Protein vorhanden und in welchem Zellkompartiment es lokalisiert ist.

Hierfür wurde im Zuge der Arbeit der Nachweis durch die Streptavidin-/Biotin-Komplexbildung, die sogenannte ABC-Methode, angewendet. Bei diesem Nachweisverfahren wurde das Zielantigen während einer 60-minütigen Inkubation von den in Dako REAL™ Antibody Diluent verdünnten Primärantikörper gebunden und anschließend für 30 Minuten mithilfe eines biotinylierten Sekundärantikörpers, welcher sich gegen Immunglobuline der Spezies des Primärantikörpers richtete, detektiert. An den biotinylierten Sekundärantikörper wurde für 30 Minuten Streptavidin gebunden. Streptavidin besitzt vier Biotin-Bindungsstellen und ist über die verbleibenden Bindungsstellen mit biotinylierten Enzymen konjugiert, wodurch die Signalstärke und damit die Sensitivität der immunhistochemischen Färbung um ein Vielfaches verstärkt wurde. Als biotinyliertes Enzym diente entweder Alkalische Phosphatase oder Meerrettichperoxidase, welches sein entsprechendes Substrat in einer Farbreaktion umsetzte. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase wurde Chromogen Red des Dako REAL™ Detection Systems nach Herstellerangaben verwendet. Das Dako EnVision™+ System HRP Kit beruht auf derselben Methodik, nutzt jedoch anstatt der Streptavidin-/Biotin-Komplexbildung eine Polymerbasis. Hierbei wurde in einem ersten Schritt die endogene Peroxidase der entparaffinisierten Duodenalschnitte für 5 Minuten blockiert, um Hintergrundfärbungen zu minimieren und anschließend eine über Nacht Inkubation bei 4°C mit dem Primärantikörper durchgeführt. Die gebundenen Antikörper wurden anschließend durch eine enzymatische Farbreaktion, bei welcher das Substrat-Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) umgesetzt wurde, nach Herstellerangaben visualisiert. Um sich im Gewebe zu orientieren, erfolgte für beide Nachweismethoden die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin. Dazu wurden die Objektträger nach erfolgter immunhistochemischer Färbung mit dH₂O gespült und für 10 Sekunden in Mayers Hämatoxylin Färbelösung überführt. Durch das Spülen mit Leitungswasser, das sogenannte Bläuen, nahmen die Zellkerne eine bläuliche Farbe an. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden die Objektträger in Kaisers Glyceringelantine eingebettet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung erfolgte am Durchlichtmikroskop Olympus BX41.

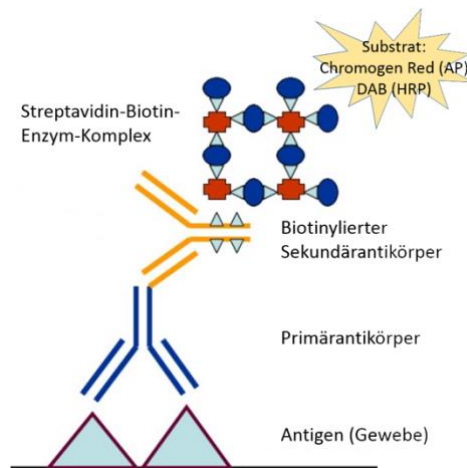


Abbildung 8: Prinzip immunhistologischer Färbungen mittels ABC-Methode.

Bei der Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC)-Methode wird das Zielantigen durch einen Primärantikörper gebunden und anschließend mithilfe eines biotinylierten Sekundärantikörpers gegen Ig der Spezies des Primärantikörpers detektiert. An den biotinylierten Sekundärantikörper bindet Streptavidin, das mit biotinylierten Enzymen Alkalische Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert ist. Abbildung modifiziert nach labce.com.

2.13 Statistik

Für die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurden die kommerziellen Kalkulationsprogramme Microsoft® Excel und GraphPad Prism verwendet. Die Auswertung der Genexpressionen erfolgte mit Unterstützung von Dr. Joachim R. Grün unter Verwendung seiner eigens programmierten Access Datenbank. Für die grafische Darstellung der Daten wurden Balken- und Einzelpunktdiagramme mit einer gruppenspezifischen Farbgestaltung gewählt. Die ermittelten HPCDA-Scores der Transkriptomanalyse wurden als Volcano-Plots visualisiert, wobei der p-Wert gegen den Fold Change aufgetragen wurde. Die Erstellung der Venn-Diagramme erfolgte mithilfe der Webseite <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

Um die Unterschiede zwischen unabhängigen Gruppen (z.B. MW-Patienten vs. gesunde Kontrollen) zu untersuchen, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Daten wurden als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs und einer explorativen Untersuchung der Fragestellung wurde nachfolgend nicht auf multiples Testen adjustiert. Die p-Werte der Analyse sind durch Sterne repräsentiert, wobei ein Stern (*) einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ entspricht. Doppelsterne (**) entsprechen einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$ und drei Sterne (***) einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur T-Lymphozyten-Reaktivität nach Stimulation mit *T. whipplei* Proteinen

Vorhergehende Studien zeigten, dass *T. whipplei* Twist MarseilleTM Lysat in gesunden Kontrollen eine *T. whipplei*-spezifische Th1-Antwort induziert [30]. MW-Patienten hingegen entwickeln sowohl in der Peripherie als auch in der intestinalen Mukosa eine verminderte Th1-Antwort auf diesen Stimulus und zeigen eine reduzierte serologische Reaktion auf *T. whipplei* Proteine [39]. Die Reaktivität gegen andere Antigene wie Tetanus-Toxin, Tuberkulin, *Giardia lamblia* oder das Zytomegalievirus ist in MW-Patienten nicht beeinträchtigt, sodass sie nicht häufiger unter anderen opportunistischen Infektionen leiden [30]. Um zu überprüfen, ob *T. whipplei* Proteine eine effektive pro-inflammatorische CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten-Antwort im peripheren Blut von MW-Patienten induzieren, wurden aufgetaute PBMC mit *T. whipplei* Lysat und dem Hsp70 Protein von *T. whipplei* (TW Hsp70) und *E. coli* (EC Hsp70) stimuliert. Zudem wurde das Stimulationspotential des GrpE Proteins von *T. whipplei* (TW GrpE) und den Kontrollen *M. tuberculosis* (MT GrpE) und *E. coli* (EC GrpE) analysiert. GrpE ist ein Co-Faktor des Hsp70 und wurde in einem serologischen, proteomischen Ansatz als *T. whipplei* Kandidaten-Antigen identifiziert, das spezifische B-Lymphozyten-Antworten induzieren kann [40]. *M. tuberculosis* und *E. coli* repräsentierten in diesem Versuch zu Vergleichszwecken andere pathogene, intrazelluläre und kommensale Bakterien.

Die Stimulation mit SEB zeigte keinen Unterschied in der Aktivierung von CD4⁺ Lymphozyten von MW-Patienten und gesunden Kontrollen (Abbildung 9.A). Die Anzahl CD69⁺/IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten nach Stimulation mit *T. whipplei* Lysat, rekombinantem TW Hsp70 und EC Hsp70 sowie TW GrpE Proteinen war in MW-Patienten signifikant vermindert ($p = 0,0001$ für alle Stimuli; Abbildung 9.B). Die Proteine MT GrpE und EC GrpE induzierten eine sehr geringe CD4⁺ T-Lymphozyten-Reaktivität, welche zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen vergleichbar war. Die CD4⁺ T-Lymphozyten-Reaktivität gesunder Kontrollen gegen die Proteine MT GrpE ($p = 0,006$) und EC GrpE ($p = 0,045$) war im Vergleich zur Reaktivität gegen TW GrpE vermindert. Zudem zeigte sich die spezifische Reaktivität gegen EC GrpE in MW-Patienten gegenüber dem TW GrpE Protein signifikant reduziert ($p = 0,021$; Abbildung 9.B).

Ein vermehrter Anteil Perforin⁺ Granzym B⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten im Vollblut von MW-Patienten wies im Vorfeld darauf hin, dass ein Kontakt zu *T. whipplei* eine zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Lymphozyten induzieren kann [191]. Basierend auf diesem Vorwissen wurde geprüft, ob die gesteigerte zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Lymphozyten auch in einer *T. whipplei*-spezifischen IFN- γ Expression nachweisbar ist. Hierzu wurden PBMC-Stimulationen mit *T. whipplei* Lysat, TW Hsp70 und EC Hsp70 sowie den rekombinanten TW GrpE, MT GrpE und EC GrpE Proteinen durchgeführt. Nach Stimulation mit SEB zeigten sich keine Unterschiede im Aktivierungspotential der CD8⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten und gesunden Kontrollen (Abbildung 10.A). In den Stimulationsansätzen mit *T. whipplei* Lysat, TW Hsp70, EC Hsp70 und TW GrpE zeigten die CD8⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen eine signifikant verminderte Anzahl spezifischer CD69⁺/IFN- γ ⁺ Zellen (Abbildung 10.B). Übereinstimmend mit den Auswertungen der CD4⁺ Lymphozyten wurde sowohl für Kontrollen als auch für MW-Patienten eine marginale Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten gegen die Kontrollproteine MT GrpE und EC GrpE nachgewiesen. Die Reaktivität der CD8⁺ Lymphozyten gegen MT GrpE und EC GrpE war in gesunden Kontrollen gegenüber TW GrpE reduziert ($p < 0,001$).

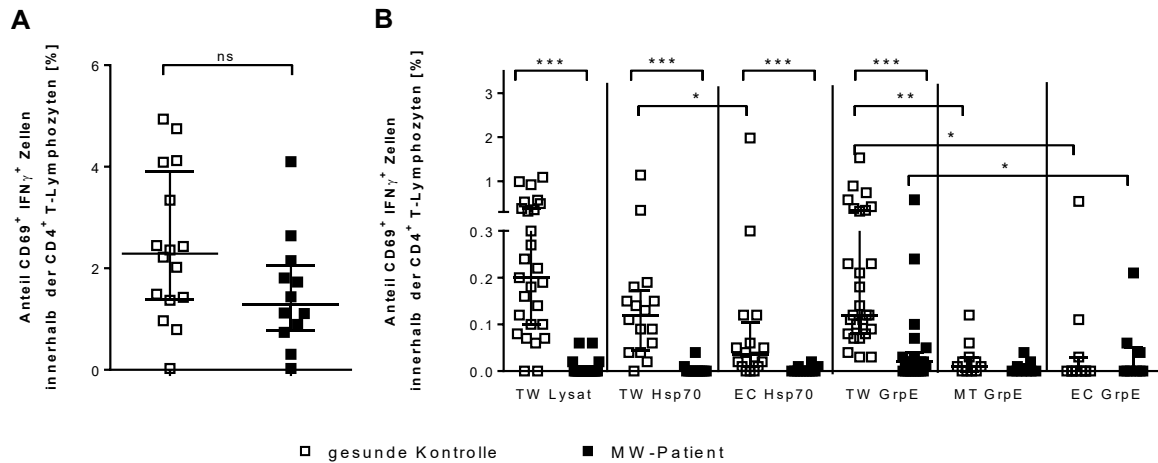


Abbildung 9: Verminderte CD4⁺ T-Lymphozyten-Reaktivität gegen TW Lysat, Hsp70 und TW GrpE in MW-Patienten.

Der Anteil aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten nach SEB Stimulation war zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten vergleichbar (A). Der Anteil aktivierter CD4⁺ Lymphozyten zeigte sich nach Stimulation mit *T. whipplei* Lysat (10⁷ Bakterien/ml), rekombinantem Hsp70 von *T. whipplei* (80 g/ml) und *E. coli* (33 g/ml) sowie rekombinantem GrpE von *T. whipplei* (50 g/ml) in MW-Patienten reduziert (B). Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Mann-Whitney U Test, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

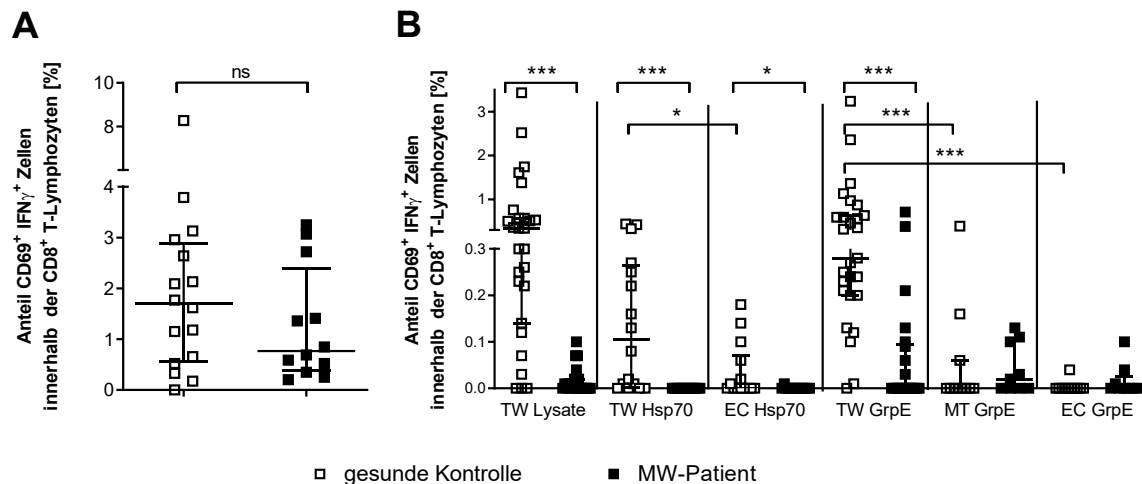


Abbildung 10: Verminderte Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten.

Der Anteil aktivierter CD8⁺ T-Lymphozyten nach SEB Stimulation war zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten vergleichbar (A). Die CD8⁺ Lymphozyten von MW-Patienten wurden durch *T. whipplei* Lysat (10⁷ Bakterien/ml), rekombinantes Hsp70 von *T. whipplei* (80 g/ml) und *E. coli* (33 g/ml) sowie rekombinantes GrpE von *T. whipplei* (50 g/ml) gegenüber gesunden Kontrollen vermindert aktiviert (B). Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Mann-Whitney U Test, * p < 0,05; *** p < 0,001.

Die Analysen zeigten, dass *T. whipplei* Lysat und die rekombinanten Proteine Hsp70 und TW GrpE in immunkompetenten Kontrollen eine adäquate CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten-Reaktion induzierten, während MW-Patienten nicht befähigt waren, eine pro-inflammatorische Immunantwort gegen die Stimuli auszulösen. Im weiteren Verlauf wurde die T-Lymphozyten-Reaktivität in einem allogenen System untersucht, das eine produktive Präsentation der GrpE Antigene über den HLA-ABC (MHC-Klasse-I)-Komplex gewährleistete. Hierzu wurden isolierte PBMC mit den sequenztragenden Plasmiden für GrpE von *T. whipplei* (pTWGrpE), *M. tuberculosis* (pMTGrpE) und *E. coli* (pECGrpE) sowie dem Plasmid p86 transfiziert. 24 Stunden nach erfolgter Transfektion zeigten sich keine Unterschiede in der

Zellvitalität (Abbildung 11.A) und Plasmidintegrität (Abbildung 11.B) zwischen Patienten und Kontrollen. Es waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Plasmidkonstrukten nachweisbar. Durchschnittlich wurden 15 % der PBMC produktiv mit den GrpE Plasmiden transfiziert.

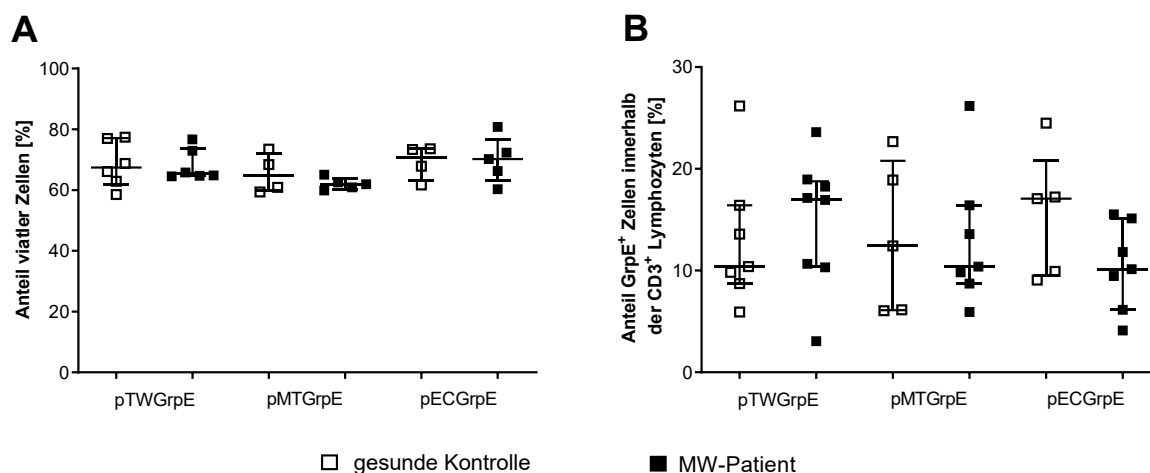


Abbildung 11: Zellvitalität und Plasmidintegrität nach GrpE Transfektion.

24 Stunden nach erfolgter GrpE Transfektion wurde die Zellvitalität mittels Trypanblau-Färbung (A) und die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch (B) bestimmt. Sowohl die Vitalität als auch die Transfektionseffizienz war zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten vergleichbar. Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt.

Den transfizierten Zellen wurden allogene PBMC zugeführt und nach 24 Stunden die Zytotoxizität der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten gegen die MHC-I präsentierten GrpE-Antigene analysiert. Innerhalb der CD8⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten wurde eine gesteigerte Perforinexpression gegen die präsentierten Antigene der pGrpETW- ($p=0,020$), pGrpEMT- ($p=0,010$) und pGrpEEC-Transfektionen ($p=0,010$) nachgewiesen. Die zytotoxischen Marker Granulysin, Granzym B und Interferon zeigten sich nach GrpE-Transfektion in MW-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen tendenziell erhöht (Abbildung 12). Es bestand keine Korrelation zwischen dem Anteil Perforin⁺ CD3⁺/CD8⁺ Lymphozyten und der Transfektionseffizienz der pTWGrpE und pMTGrpE Ansätze. Bei Transfektion von pECGrpE betrug die Korrelation zum Anteil Perforin⁺ CD3⁺/CD8⁺ Lymphozyten $r=-0,647$ (Anhang 1).

Die Analyse der CD4⁺ T-Lymphozyten zeigte zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen keinen Unterschied in der Induktion von Granulysin, Granzym B (ohne Abbildung) und IFN- γ (Abbildung 13.B). Perforin wurde von den CD4⁺ T-Lymphozyten lediglich marginal exprimiert. Die Anzahl der Perforin⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten war nach Stimulation mit pGrpEMT ($p=0,018$) und pGrpEEC ($p=0,010$) in MW-Patienten gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Die Expression von Perforin⁺ zeigte sich nach pGrpETW Transfektion in MW-Patienten tendenziell induziert (Abbildung 13.A).

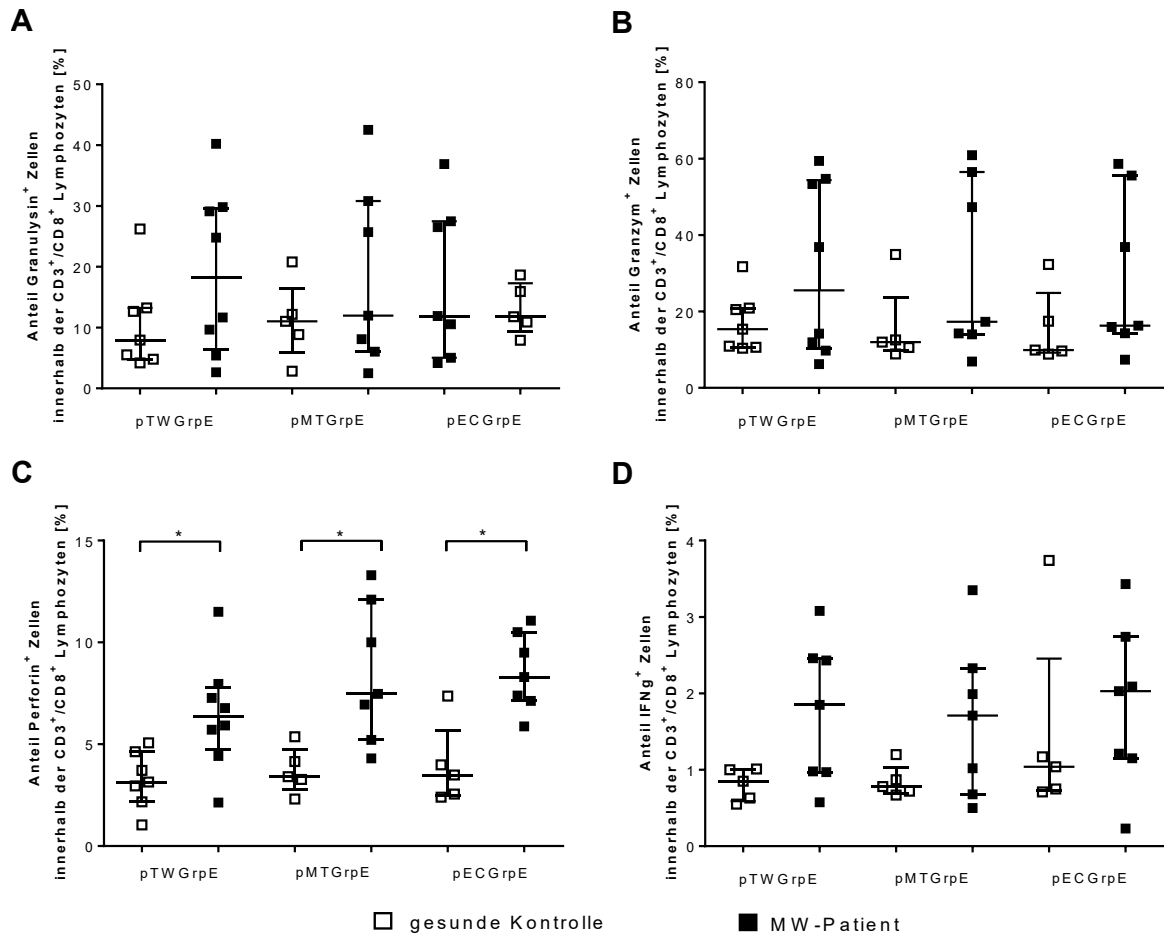


Abbildung 12: Induzierte zytotoxische Aktivität der CD8⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten nach optimierter Antigen-Präsentation.

Nach Transfektion von pTWGrpE, pMTGrpE und pECGrpE war ein visueller Anstieg der zytotoxischen Marker Granulysin und Granzym B und Interferon-γ erkennbar (**A, B, D**). Der Anteil Perforin⁺ CD8⁺ Lymphozyten war bei optimierter Antigenpräsentation der GrpE-Antigene in MW-Patienten erhöht (**C**). Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Mann-Whitney U Test. * p<0,05.

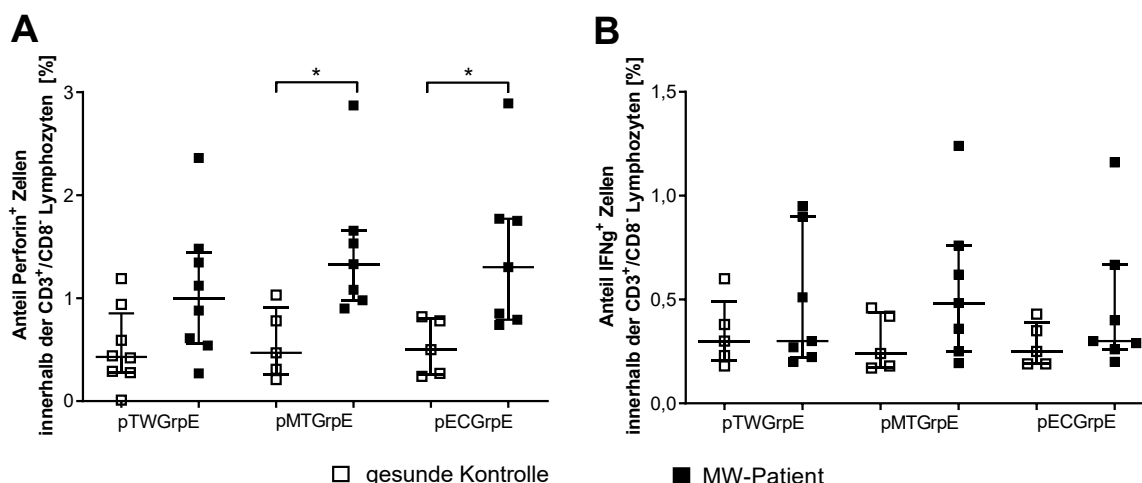


Abbildung 13: Induzierte Perforinexpression der CD4⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten nach optimierter Antigen-Präsentation.

Der Anteil Perforin⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten war bei optimierter Antigenpräsentation der Antigene GrpEMT und GrpEEC in MW-Patienten erhöht. Nach Transfektion von pTWGrpE war die Induktion Perforin⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten visuell erkennbar (A). Für den Anteil IFN-γ⁺ CD4⁺ Lymphozyten wurden zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten keine Unterschiede detektiert (B). Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Mann-Whitney U Test, * $p < 0,05$.

Die Untersuchungen zur T-Lymphozyten-Reaktivität verdeutlichten eine verminderte Fähigkeit der MW-Patienten gegen *T. whipplei* Lysat und die rekombinanten Proteine Hsp70 und TW GrpE eine adäquate Immunantwort auszulösen. Bei produktiver Präsentation der GrpE Antigene über den HLA-ABC-Komplex wurde ein Anstieg der Perforin⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in MW-Patienten detektiert. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die verminderte T-Lymphozyten-Reaktion in MW-Patienten nicht auf einen T-Lymphozyten-Defekt oder eine T-Lymphozyten-Anergie, sondern auf eine Dysfunktion im Zuge der Antigenprozessierung oder -präsentation durch Mφ zurückzuführen ist.

3.2 Untersuchungen zur Interaktion von *T. whipplei* Bakterien mit humanen Mφ

Basierend auf den vorhergehenden Ergebnissen entstand die Hypothese, dass *T. whipplei* mit den Mφ von MW-Patienten interagiert und die Antigenpräsentation aktiv moduliert. Die Hypothese wurde durch Studien bekräftigt, die eine erhöhte Anzahl alternativ aktivierter Mφ2 in MW-Patienten nachwiesen [35, 116]. Um zu prüfen, ob *T. whipplei* die alternative Aktivierung induzieren und die Genexpression der Mφ modulieren kann, wurde sowohl der Phänotyp als auch das Transkriptom *in vitro* differenzierter Mφ von gesunden Kontrollen und MW-Patienten unter dem Einfluss einer *T. whipplei* Infektion analysiert.

3.2.1 *In vitro* Polarisation von Mφ

Grundlage für die Analyse des Einflusses von *T. whipplei* auf die Mφ Polarisation stellte die *in vitro* Generierung von klassisch aktivierten Mφ1 und alternativ aktivierten Mφ2 dar. Hierzu wurden frisch isolierte CD14⁺ Monozyten nach dem Protokoll von Verreck *et al.* mit GM-CSF und M-CSF inkubiert [103]. Lichtmikroskopisch ließen sich bereits an Tag 3 der Differenzierung morphologische Unterschiede zwischen beiden Mφ-Subtypen erkennen, die sich mit anhaltender Dauer der Kultivierung verstärkten. Mφ1 zeigten eine rundliche Morphologie, während sich Mφ2 zu spindelförmig gestreckten Zellen entwickelten. Im Zuge einer *T. whipplei* Infektion wurde keine Veränderung der Zellmorphologie nachgewiesen (Abbildung 14). Zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten wurde kein morphologischer Unterschied detektiert.

Das lichtmikroskopische Bild lieferte erste Hinweise auf die erfolgreiche *in vitro*-Polarisation der M ϕ -Subtypen. Um die Polarisation in M ϕ 1 und M ϕ 2 zu bestätigen, wurde an Tag 14 der *in vitro* Differenzierung die Expression der M ϕ -Marker CD14, CD16, CD68, CD163, HLA-DR und CCL-18 durchflusszytometrisch analysiert. M ϕ 1 exprimierten gegenüber M ϕ 2 signifikant verminderte Level an CD14 ($p \leq 0,0001$ und $p = 0,0002$), CD163 ($p = 0,0001$ und $p = 0,007$) und HLA-DR ($p \leq 0,0001$ und $p = 0,0281$) (Abbildung 15.A, D, E). Der Nachweis einer M ϕ -Polarisierung anhand der Marker CD68 ($p = 0,0094$) und CCL-18 ($p = 0,045$) wurde nur für die Kontrollgruppe nachgewiesen (Abbildung 15.C, F). Die Analyse der CD16 Expression ermöglichte keine Unterscheidung der M ϕ 1 und M ϕ 2 Populationen (Abbildung 15.B). Die M ϕ 1 der MW-Patienten zeigten gegenüber gesunden Kontrollen eine erhöhte Expression von CD163 ($p = 0,041$). Alle weiteren M ϕ Marker wiesen keine Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten auf.

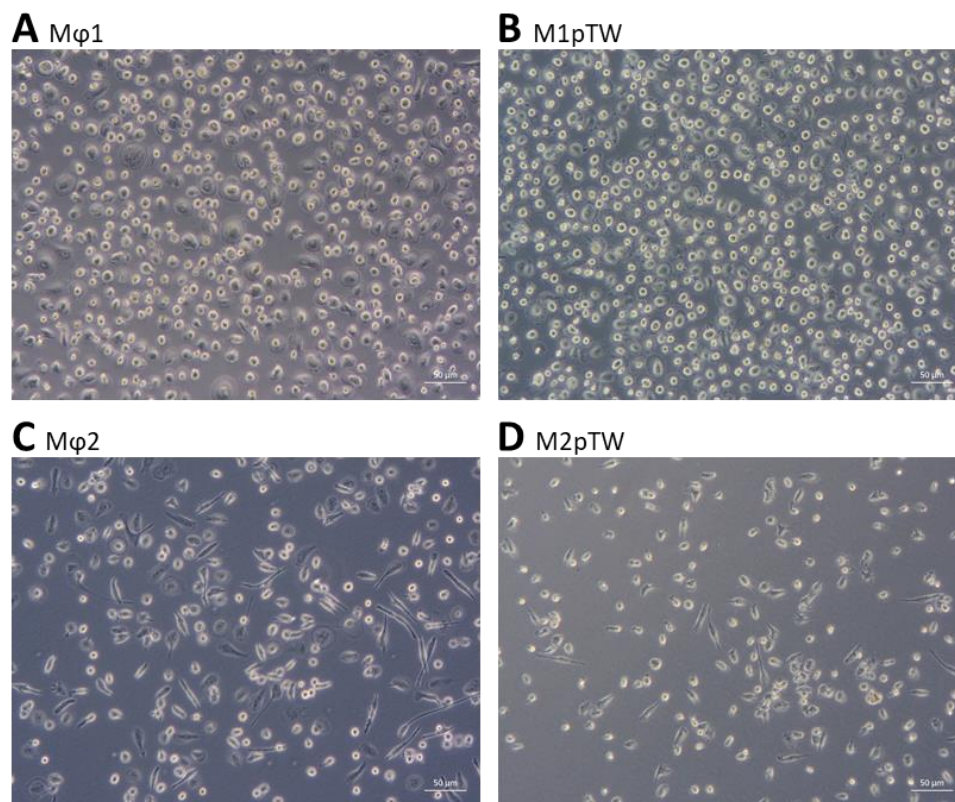


Abbildung 14: Die Morphologie *in vitro* differenzierter M ϕ wird durch *T. whipplei* nicht beeinflusst.

CD14⁺ Monozyten wurden auf eine Zellzahl von 5×10^5 /ml eingestellt und *in vitro* in **M ϕ 1 (A)** oder M ϕ 2 (**C**) polarisiert. An Tag 7 der Polarisation erfolgte die Infektion mit *T. whipplei* (**B, D**). Exemplarisch sind Bilder an Tag 5 der Differenzierung dargestellt. Im dargestellten Beispiel adhärten M ϕ 1 fester am Boden der 6-Loch Kulturplatten als M ϕ 2, wodurch sich die Zelldichte beider Populationen unterschied.

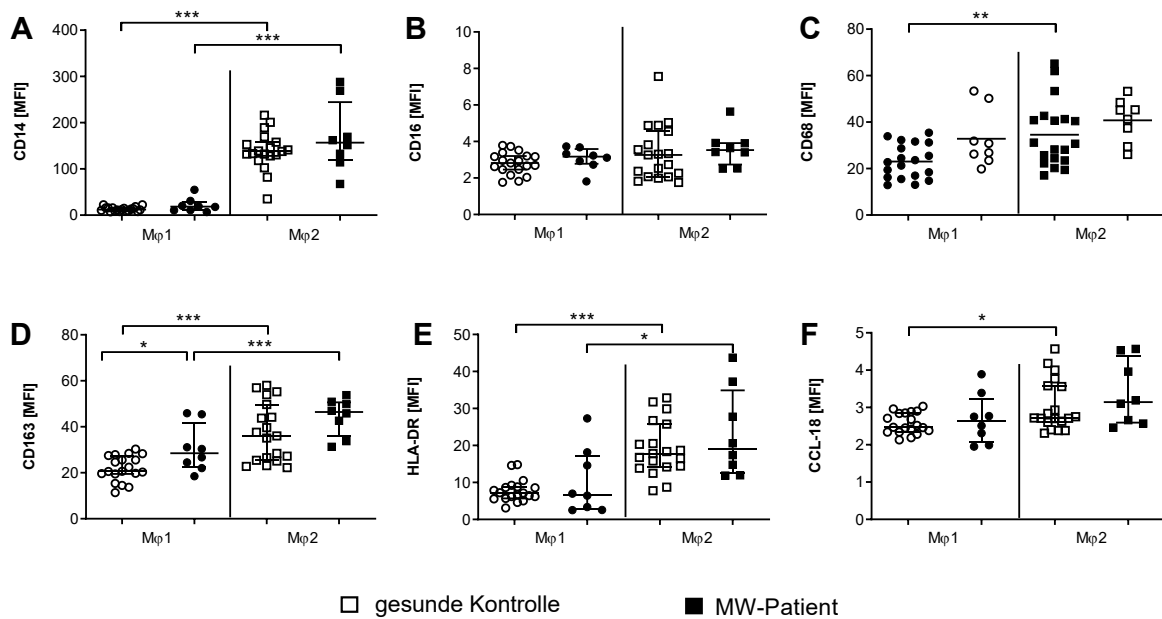


Abbildung 15: Phänotypische Unterscheidung von Mφ1 und Mφ2.

Mφ1 und Mφ2 wurden an Tag 14 ihrer *in vitro* Differenzierung auf die Oberflächenexpression von CD14 (A), CD16 (B), CD163 (D) sowie HLA-DR (E) analysiert. Die Marker CD68 (C) und CCL-18 (F) wurden intrazellulär gefärbt. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität. Die Werte sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Mann-Whitney U Test, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

3.2.2 Beeinflussung des Mφ-Phänotyps durch *T. whipplei* und bakterielle Bestandteile

Die morphologischen und phänotypischen Analysen bestätigten die erfolgreiche *in vitro* Differenzierung der Mφ1 und Mφ2. Im Folgenden wurde analysiert, ob *T. whipplei* befähigt ist, den Phänotyp der Mφ aktiv zu modulieren. Hierzu wurden CD14⁺ Monozyten mit vitalen *T. whipplei* Bakterien sowie dem Kontrollbakterium *M. bovis* BCG infiziert und *in vitro* zu Mφ1 und Mφ2 polarisiert. Zur Überprüfung der aktiven Modulation wurde zudem der Einfluss von *T. whipplei* Lysat und zellfreiem Bakterienüberstand einer *T. whipplei* Kultur auf die Mφ-Polarisierung untersucht. An Tag 14 und 21 nach Infektion erfolgte die Analyse der Mφ-Marker CD14, CD16, CD68, CD163, HLA-DR und CCL-18 gegenüber nicht stimulierten Mφ. Die durchgeführten Analysen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen, sodass beide Gruppen in Abbildung 16 zusammengefasst wurden.

Die CD14 Expression *T. whipplei* infizierter Mφ2 (M2pTW) war an Tag 14 um durchschnittlich 20,3 % (p=0,018; gesunde Kontrollen (n=14): 20,7 %; MW-Patienten (n=8): 19,5 %) und an Tag 21 um 32,0 % (p=0,026; gesunde Kontrollen (n=12): 38,8 %; MW-Patienten (n=3): 4,8 %) reduziert. Die Stimulation mit TW Lysat resultierte innerhalb der Mφ1 in einer vermehrten CD14 Expression. Konträr wurde bei Infektion mit *M. bovis* BCG (M2pBCG) eine tendenziell verminderte CD14 Expression innerhalb der Mφ2 detektiert (Abbildung 16.A).

Die Expression des Fc Rezeptors CD16 wurde nach *T. whipplei* Infektion induziert. Nach einer primären CD16 Repression wurde in *T. whipplei* infizierten Mφ1 (M1pTW) an Tag 21 eine um durchschnittlich 10,6 % verstärkte Expression nachgewiesen (p=0,0419; gesunde Kontrollen (n=9): 13,2 %; MW-Patienten (n=5): 5,9 %). Innerhalb der M2pTW betrug die Induktion durchschnittlich 33,2 % (p=0,0017; gesunde Kontrollen (n=12): 25,4 %; MW-Patienten (n=3): 64,2 %). Dieser Effekt wurde lediglich durch vitale *T. whipplei* Bakterien hervorgerufen. Die Stimulation mit bakteriellem Lysat, zellfreiem

Bakterienüberstand oder *M. bovis* BCG resultierte in keiner Änderung der CD16 Expression (Abbildung 16.B).

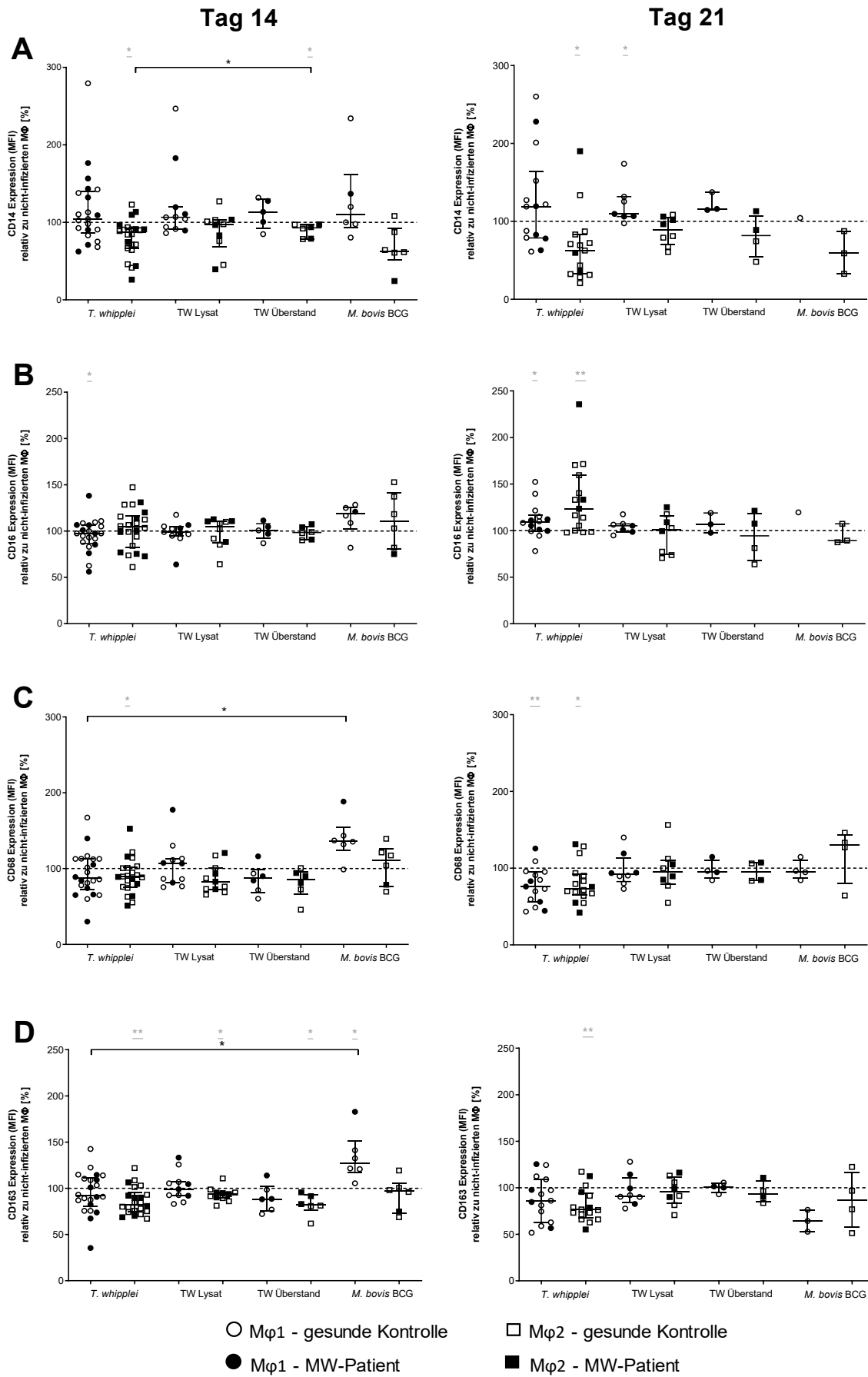
Die M ϕ -Marker CD68, CD163, HLA-DR und CCL-18 wurden unter dem Einfluss einer *T. whipplei* Infektion vermindert exprimiert. Die CD68 Expression zeigte sich innerhalb der M2pTW an Tag 14 um 9,7 % und an Tag 21 um 19 % vermindert ($p=0,02$ für beide Zeitpunkte). Innerhalb der M1pTW wurde an Tag 21 eine Reduktion der CD68 Expression um 23 % nachgewiesen ($p=0,0034$) (Abbildung 16.C).

Die CD163 Expression innerhalb der M2pTW Population war gegenüber nicht infizierten M ϕ signifikant vermindert. An Tag 21 der Kultivierung zeigte sich die CD163 Expression innerhalb der M2pTW um durchschnittlich 18,9 % reduziert ($p=0,0029$; gesunde Kontrollen ($n=12$): 20,37 %; MW-Patienten ($n=4$): 14,42 %). Nach Stimulation mit bakteriellem Lysat und zellfreiem Bakterienüberstand wurde an Tag 14 eine verminderte CD163 Expression nachgewiesen ($p=0,0322$ und $p=0,0313$). Diese zeigte an Tag 21 keinen Bestand. Die CD163 Expression der M ϕ 1 wurde durch *T. whipplei* nicht beeinflusst. M1pBCG wiesen an Tag 14 gegenüber M1pTW eine verstärkte CD163 Expression auf ($p=0,0313$) (Abbildung 16.D).

HLA-DR, ein MHC-II Gen, unterlag bei Präsenz intrazellulärer *T. whipplei* der stärksten Modulation. M1pTW und M2pTW wiesen signifikant reduzierte HLA-DR Expressionswerte auf, wobei die Reduktion der HLA-DR Expression in MW-Patienten stärker ausgeprägt war als bei gesunden Kontrollen. Die Verminderung der HLA-DR Expression der M1pTW betrug an Tag 21 32,6 % für gesunde Kontrollen ($n=10$) und 63,4 % für MW-Patienten ($n=5$). Innerhalb der M2pTW wurde eine um 40,1 % verminderte HLA-DR Expression in gesunden Kontrollen ($n=12$) nachgewiesen. In MW-Patienten betrug die Reduktion 46 % ($n=4$). M1pBCG wiesen eine tendenzielle Induktion der HLA-DR Expression auf (Abbildung 16.E).

Im Zuge der *T. whipplei* Infektion wurde eine Expressionsrepression des Chemokins CCL-18 nachgewiesen. Die CCL-18 Expression war in M1pTW an Tag 14 um 10,4 % ($p=0,0002$) und in M2pTW um 13 % ($p=0,0004$) reduziert. An Tag 21 zeigte sich die Expression von CCL-18 in M1pTW um 14,9 % und in M2pTW um 18,1 % reduziert. Konträr wurde für M1pBCG eine Erhöhung der CCL-18-Expression um 21,1 % ($p=0,031$) detektiert (Abbildung 16.F).

Tabelle 21 stellt die Ergebnisse der phänotypischen Untersuchungen zusammenfassend dar. Die Analyse verdeutlichte, dass eine Infektion mit *T. whipplei* überwiegend in einer Repression der analysierten Marker resultierte, wobei die detektierten Modulationen innerhalb der M ϕ 2 stärker ausgeprägt waren als in M ϕ 1. *M. bovis* BCG Infektionen resultieren primär in einer Expressionsinduktion, welche überwiegend in M ϕ 1 nachweisbar war. Stimulationen mit *T. whipplei* Lysat und zellfreiem Bakterienüberstand riefen keine phänotypischen Veränderungen hervor, sodass auf eine aktive Modulation durch *T. whipplei* geschlossen werden konnte.



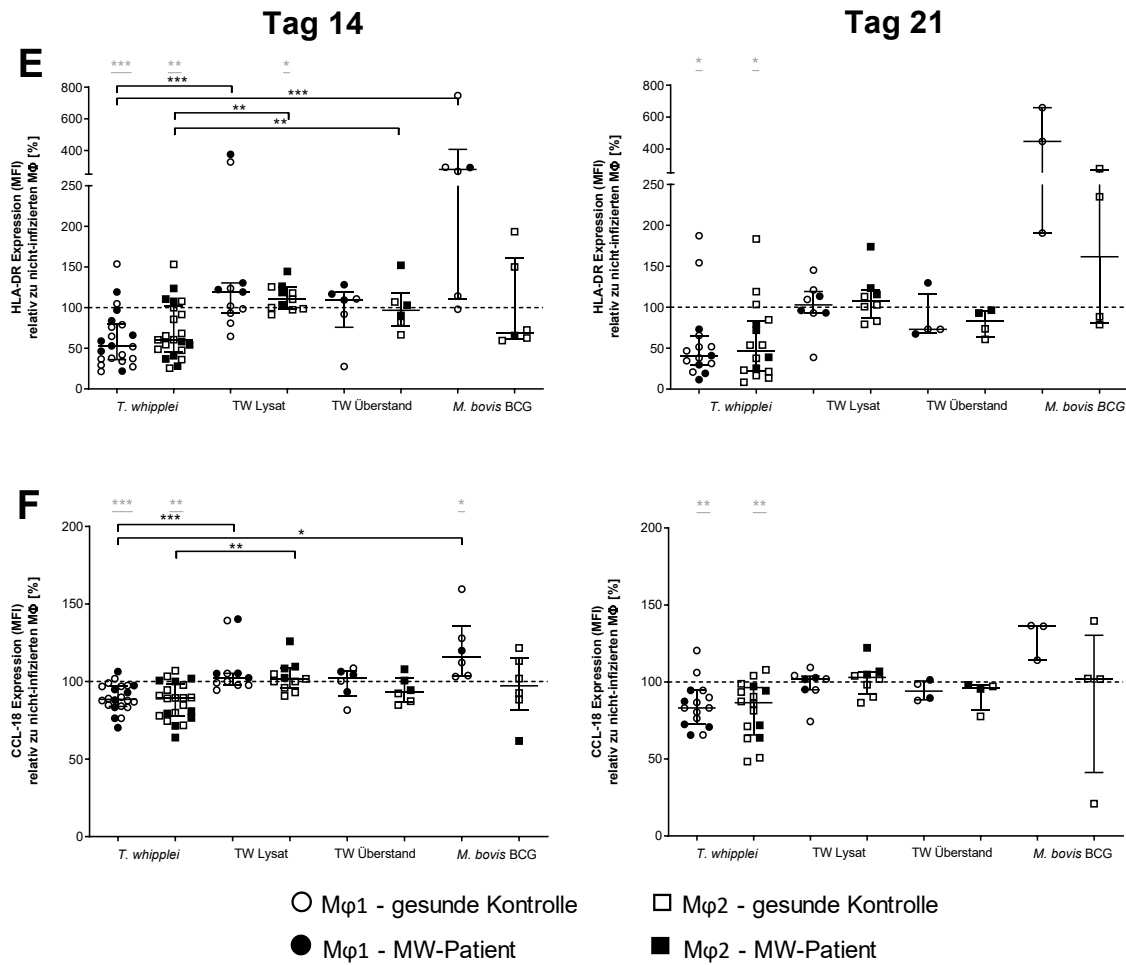


Abbildung 16: *T. whipplei* Infektionen resultieren in einer Änderung des Mφ Phänotyps.

CD14⁺ Monozyten wurden aus PBMC isoliert und für 4 Stunden bei 37°C mit vitalen *T. whipplei* und *M. bovis* BCG Bakterien, sowie *T. whipplei* Lysat infiziert und *in vitro* zu Mφ1 und Mφ2 polarisiert. An Tag 14 (linke Spalte) und Tag 21 (rechte Spalte) erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD14, CD16, CD68, CD163, HLA-DR und CCL-18 gegenüber nichtinfizierten Mφ. Als Kontrollansatz wurden Stimulationen mit dem Überstand einer *T. whipplei* Kultur mitgeführt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Expression gegenüber nicht stimulierten Mφ (gestrichelte Linie = 100%). Die Berechnung erfolgte für jeden MW-Patienten, bzw. für jede gesunde Kontrolle separat. Datenpunkte von gesunden Kontrollen sind als leere, Messwerte von MW-Patienten als gefüllte Symbole dargestellt. Zwischen beiden Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert. Nach Infektion mit vitalen *T. whipplei* zeigte sich eine Verminderung der CD14 Expression in M2pTW (A), eine Induktion der CD16 Expression (B), eine Reduktion der CD68 Expression (C) sowie eine verminderte CD163 Expression in M2pTW (D). Die Expression von HLA-DR war nach Infektion mit *T. whipplei* signifikant reduziert, während die Infektion mit *M. bovis* BCG in einer Induktion der HLA-DR Expression resultierte (E). Ebenso wurde CCL-18 durch *T. whipplei* und *M. bovis* BCG gegensätzlich moduliert (F). Graue Sterne (*) symbolisieren Signifikanzen gegenüber nicht infizierten Mφ, schwarze Sterne (**) Signifikanzen der gepoolten Gruppen untereinander. Die erhobenen Daten sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Mann-Whitney U Test, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Tabelle 21: Expressionstendenzen der Mφ-Marker CD14, CD16, CD68, CD163, HLA-DR und CCL-18 nach Stimulation.

CD14⁺ Monozyten wurden aus frischen PBMC isoliert und für 4 Stunden bei 37°C mit *T. whipplei*, *T. whipplei* Lysat und *M. bovis* BCG infiziert. Nach Elimination extrazellulärer Bakterien wurden die infizierten Zellen in Mφ1 und Mφ2 differenziert. Dem Zellkulturansatz mit *T. whipplei* Überstand wurden täglich 10 µl Überstand einer *T. whipplei* Kultur zugesetzt. An Tag 14 und Tag 21 nach Infektion wurde die Expression der Mφ-Marker durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Expressionstendenzen gegenüber nicht stimulierten Mφ. Schwarze Pfeile symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede. Graue Pfeile weisen auf Tendenzen hin, die aufgrund der geringen Fallzahl nicht statistisch ausgewertet werden konnten. Sind keine Symbole angegeben, lag keine Expressionsänderung vor. ↑: Induktion der Expression; ↓ Reduktion der Expression. TW: *T. whipplei*; ÜS: Überstand; BCG: *M. bovis* BCG.

	T14								T21							
	Mφ1				Mφ2				Mφ1				Mφ2			
	+TW	+Lysat	+ÜS	+BCG	+TW	+Lysat	+ÜS	+BCG	+TW	+Lysat	+ÜS	+BCG	+TW	+Lysat	+ÜS	+BCG
CD14					↓		↓			↑			↓			↓
CD16					↓				↑				↑			
CD68				↑	↓				↓				↓			
CD163				↑	↓	↓	↓						↓			↓
HLA-DR	↓			↑	↓	↑			↓			↑	↓			↑
CCL-18	↓			↑	↓				↓			↑	↓			

3.2.3 Einfluss von *T. whipplei* und *M. bovis* BCG auf das Zytokinprofil von Mφ

Die Ergebnisse der phänotypischen Analysen wiesen darauf hin, dass *T. whipplei* mit den Zellen des angeborenen Immunsystems interagiert und den Phänotyp der Mφ aktiv moduliert. Da das sekretierte Zytokinprofil von Mφ essenziell für die Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten verantwortlich ist, wurden die Überstände infizierter Mφ von MW-Patienten und gesunden Kontrollen mittels CBA auf die Präsenz von IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sowie IFN-γ und TNF-α untersucht. Mφ1 sind durch die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-α charakterisiert, während Mφ2 die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IFN-γ produzieren [79, 102, 104].

Die IL-6 Synthese war in den Mφ1 gegenüber den Mφ2 ($p=0,004$) induziert. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen. Infektionen der Mφ1 mit *T. whipplei* (M1pTW) und *M. bovis* BCG (M1pBCG) resultierten in einer tendenziellen Induktion der IL-6 Sekretion. Zudem wurde eine vermehrte IL-6 Sekretion der M2pBCG gesunder Kontrollen gegenüber nicht stimulierten und M2pTW nachgewiesen ($p=0,0095$; Abbildung 17.A). Das pro-inflammatorische Zytokin TNF-α wurde von M1pTW und M1pBCG gesunder Kontrollen und MW-Patienten verstärkt exprimiert. Innerhalb der M2pTW und M2pBCG wurde keine vermehrte TNF-α Sekretion nachgewiesen. Es existierten keine Unterschiede zwischen MW-Patienten und Kontrollen (Abbildung 17.B). Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wurde von den Mφ2 gesunder Kontrollen und MW-Patienten vermehrt sekretiert ($p=0,0124$ bzw. $p=0,0294$; Abbildung 17.C). Die IL-10 Expression war in M2pBCG gegenüber nicht stimulierten Mφ und M2pTW signifikant reduziert ($p=0,0114$ und $p=0,0151$; Abbildung 17.B). Die Reduktion der Interleukin-Produktion wurde ebenfalls für IL-5 der M2pBCG nachgewiesen ($p=0,0213$; ohne Abbildung). Die *T. whipplei* Infektion resultierte in keiner Änderung der IL-5 Expression. Für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-13 und INF-γ konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen gezeigt werden (ohne Abbildung).

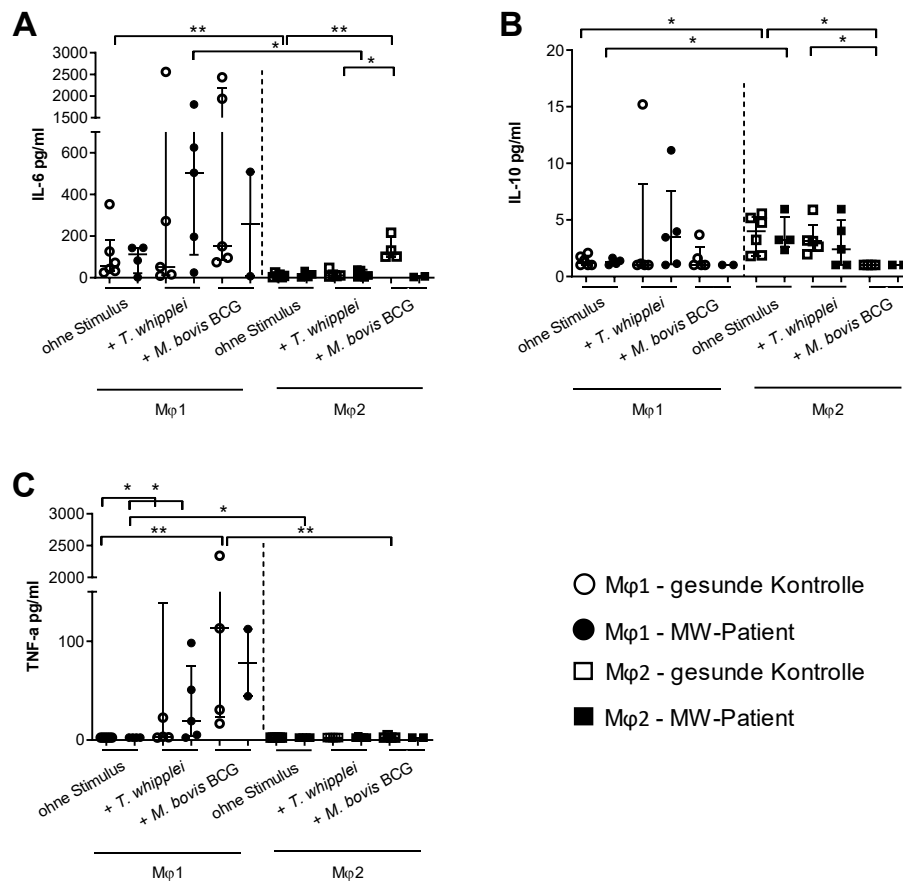


Abbildung 17: Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-α in M1pTW und M1pBCG.

PBMC wurden mit *T. whipplei* und *M. bovis* BCG infiziert und anschließend in Mφ1 und Mφ2 differenziert. An Tag 14 der Kultivierung wurde die spezifische Produktion von IL-6 (**A**), IL-10 (**B**) und TNF-α (**C**) im Überstand mittels CBA gemessen. *T. whipplei* und *M. bovis* BCG induzierten die IL-6 und TNF-α Produktion in Mφ1. IL-10 wurde vermehrt von Mφ2 sekretiert. Die IL-10 Sekretion zeigte sich bei Vorliegen einer *M. bovis* BCG Infektion reduziert. IL: Interleukin; TNF: Tumornekrosefaktor; Mφ1: klassisch aktivierte Mφ; Mφ2: alternativ aktivierte Mφ; MW: Morbus Whipple. Die erhobenen Daten sind als Median mit Quartilsabständen dargestellt. Mann-Whitney U Test, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.3 Transkriptomanalyse *in vitro* differenzierter Mφ und *T. whipplei* induzierte Änderungen der Genexpression

Die verminderte Expression der MHC-II Moleküle im Zuge einer *T. whipplei* Infektion sprach für eine aktive Immunmodulation durch *T. whipplei*, welche die spezifische Abwehr selektiv schwächt und die Erreger dazu befähigt, den Abwehrmechanismen der Mφ zu entgehen und intrazellulär zu persistieren. Um weitere Informationen über die Interaktion von *T. whipplei* mit humanen Mφ zu erhalten, wurden differenziell exprimierte Gene sowie transkriptionelle Veränderungen im Zuge einer *T. whipplei* Infektion unter produktiven und protektiven Infektionsbedingungen mittels Mikroarray-Technologie analysiert.

3.3.1 Etablierung produktiver und protektiver Bedingungen einer *T. whipplei* Infektion

Zur Etablierung von produktiven und protektiven Infektionsbedingungen wurde der Einfluss der Zytokine IL-1β, IL-10, IL-16 und anti-IL-16 sowie IFN-γ, TNF-α und Thioredoxin auf die *T. whipplei* Replikation in humanen Mφ analysiert. Hierzu wurden *in vitro* differenzierte Mφ für 18 Stunden mit den Zytokinen prä-inkubiert und anschließend mit *T. whipplei* infiziert. Der Nachweis intrazellulärer Bakterien erfolgte unmittelbar nach Infektion (T0) und nach 7-tägiger Kultivierung (T7) mittels *rpoB*

RT-PCR (Anhang 2 und 3). Die Kultivierung erfolgte unter täglicher Zytokingabe. Als interne Kontrolle wurde für jede RNA Extraktion eine 1ml *T. whipplei* Kultur mitgeführt. Diese lieferte für alle durchgeführten Analysen vergleichbare CT-Werte ($CT=21,46\pm0,167$).

Die CT-Werte der Mφ1 an T0 waren für IL-1β, IL-10, IL-16, IFN-γ, Thioredoxin und den Zellkulturansatz ohne Prä-Inkubation vergleichbar ($CT=36,33\pm0,5$; Tabelle 22). Für Kontrolle 1 wurde an T7 keine bakterielle RNA mittels *rpoB* RT-PCR nachgewiesen. Kontrolle 2 degradierte die RNA unvollständig, was für individuelle Eliminierungskapazitäten zwischen den Kontrollen sprach. Die Inkubation der Mφ1 mit TNF-α resultierte in einem geringfügig erhöhten CT_{T0} -Wert ($CT=37,74$), welcher auf eine verminderte Phagozytose der Erreger hindeutete. Unter dem Einfluss von TNF-α war eine Proliferation der intrazellulären *T. whipplei* Bakterien zu verzeichnen, die sich in einer Reduktion der CT-Werte von T7 gegenüber T0 widerspiegelte ($\Delta CT=+2,31$; Tabelle 22). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Kultivierung der Mφ1 mit 10 ng TNF-α als produktiver Ansatz der *T. whipplei* Infektion gewählt.

Die *rpoB* RT-PCR wies eine geringfügig gesteigerte Phagozytose der Mφ2 nach ($CT_{M\phi1}=36,33\pm0,5$ gegenüber $CT_{M\phi2}=35,52\pm0,34$). Die Internalisierung der *T. whipplei* Bakterien durch Mφ2 wurde durch IL-16 nicht beeinflusst. Die Prä-Inkubation der Mφ2 mit IL-10 resultierte in einer verstärkten Phagozytose der Erreger ($CT_{T0}=33,15$). In allen Mφ2 Ansätzen wurde *T. whipplei* innerhalb der 7-tägigen Kultivierung eliminiert, sodass an T7 kein Nachweis bakterieller RNA möglich war. Da die stärkste Degradation für IL-10 prä-inkubierte Mφ2 nachgewiesen wurde, wurde die Kultivierung mit 10 ng IL-10 als protektiver Ansatz einer *T. whipplei* Infektion gewählt.

Tabelle 22: CT-Werte der *rpoB* RT-PCR zur Analyse der intrazellulären *T. whipplei* Replikation.

In vitro differenzierte Mφ wurden für 18 Stunden mit den Zytokinen prä-inkubiert und anschließend mit *T. whipplei* infiziert. Nach erfolgter Infektion (T0) und 7-tägiger Kultivierung bei täglicher Zytokinzugabe (T7) erfolgte die RNA Extraktion und deren Umschreibung in cDNA. Die Detektion von *T. whipplei* cDNA und die Bestimmung der CT-Werte erfolgte anhand der *rpoB* RT-PCR. * Eine Wiederholung des PCR-Laufs wies keine bakterielle DNA nach. CT: *Threshold Cycle*; nnwb: nicht nachweisbar.

Spender	Infektions-status	Zeitpunkt der Probenahme	Zytokin	CT1	CT2
Gesunde Kontrolle 1	Mφ1	T7	Ohne Zytokin	Nicht nachweisbar	
	M1pTW	T0	Ohne Zytokin	36,58	35,88
	M1pTW	T7		Nicht nachweisbar	
	M1pTW	T0	Thioredoxin	36,0	36,15
	M1pTW	T7		38,48*	nnwb
	M1pTW	T0	Anti-IL-16	36,81	36,08
	M1pTW	T7		Nicht nachweisbar	
	M1pTW	T0	IFN-γ	36,77	36,39
	M1pTW	T7		Nicht nachweisbar	
	M1pTW	T0	IL-1β	36,47	37,36
	M1pTW	T7		Nicht nachweisbar	
Gesunde Kontrolle 2	Mφ1	T7	Ohne Zytokin	Nicht nachweisbar	
	M1pTW	T0	Ohne Zytokin	36,0	35,51
	M1pTW	T7		37,32	37,61
	M1pTW	T0	TNF-α	37,76	37,72
	M1pTW	T7		34,93	35,93

Spender	Infektions- status	Zeitpunkt der Probenahme	Zytokin	CT1	CT2
Gesunde Kontrolle 3	Mφ2	T7	Ohne Zytokin	Nicht nachweisbar	
	M2pTW	T0	Ohne Zytokin	35,47	35,67
	M2pTW	T7		Nicht nachweisbar	
	M2pTW	T0	IL-16	35,07	35,86
	M2pTW	T7		Nicht nachweisbar	
	M2pTW	T0	IL-10	33,13	33,17
	M2pTW	T7		Nicht nachweisbar	
<i>T. whipplei</i> Kultur	Kontrolle 1	Positivkontrolle für RNA-Extraktion und Vergleichbarkeit der <i>rpoB</i> RT-PCR		21,45	21,33
	Kontrolle 2			21,77	21,36
	Kontrolle 3			21,34	21,51

3.3.2 Einfluss von IL-10 und TNF- α auf die extrazelluläre *T. whipplei* Replikation

Um auszuschließen, dass die CT-Wertänderungen der *rpoB* RT-PCR auf eine Beeinflussung extrazellulär vorliegender *T. whipplei* durch IL-10 und TNF- α zurückzuführen waren, wurde das Wachstum einer Bakterienkultur unter Zusatz beider Zytokine anhand der OD₆₀₀ verfolgt. Als Kontrollen wurden Bakterienkulturen ohne Zytokinzusatz und Kulturen mit 4 mg/l Gentamicin mitgeführt. Gentamicin war als Antibiotikum gegen *T. whipplei* bekannt [192, 193].

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde durch tägliche Gabe von IL-10 und TNF- α nicht beeinflusst. Unter Zugabe von 4 mg/l Gentamicin wurde bereits an Tag 3 eine Verminderung der OD₆₀₀ und somit eine Abtötung der *T. whipplei* Bakterien nachgewiesen (Abbildung 18). Die Ergebnisse dieses Experiments verdeutlichten, dass die Zytokine IL-10 und TNF- α das Wachstum von *T. whipplei* nicht direkt beeinflussten, sondern durch Interaktion mit Mφ produktive sowie protektive Replikationsbedingungen induzierten.

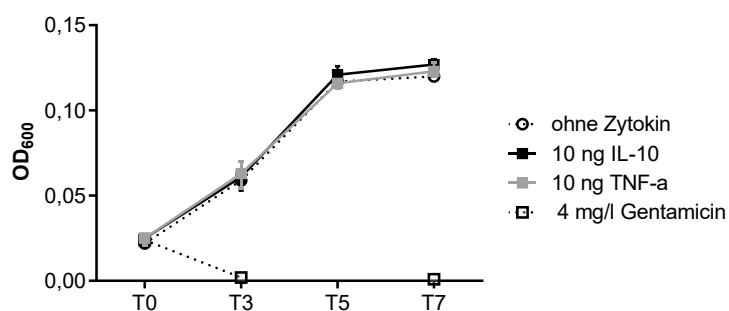


Abbildung 18: Keine Beeinflussung der extrazellulären Replikation durch IL-10 und TNF- α .

Dargestellt ist das Wachstum einer *T. whipplei* Bakterienkultur anhand der OD₆₀₀. Die Messung erfolgte an T0 (Ansatz der Kultur), T3, T5 und T7 gegen Zellkulturmedium. Als Positivkontrolle der *T. whipplei* Abtötung wurde eine Kultur mit 4 mg/l Gentamicin mitgeführt. OD₆₀₀: optische Dichte bei 600nm. Die Nummerierung der Patienten und Kontrollen diente der Identifikation im Probenregister der AG Schneider/Moos.

3.3.3 RNA-Qualitätskontrolle und Datennormalisierung

In vitro differenzierte M ϕ 1 und M ϕ 2 von zwei MW-Patienten ohne bestehende *T. whipplei* Kolonisation und zwei gesunden Kontrollen wurden unter den zuvor definierten produktiven (+ 10 ng TNF- α) und protektiven (+10 ng IL-10) Infektionsbedingungen mit *T. whipplei* infiziert. Nach 7-tägiger Kultivierung erfolgte die mRNA Isolation und deren Qualitätskontrolle mittels Bioanalyzer. Die Auswertung des RNA-Integritätswerts (RIN) ist in Abbildung 19 dargestellt. Es zeigte sich für alle Proben ein RIN-Wert $\geq 9,0$.

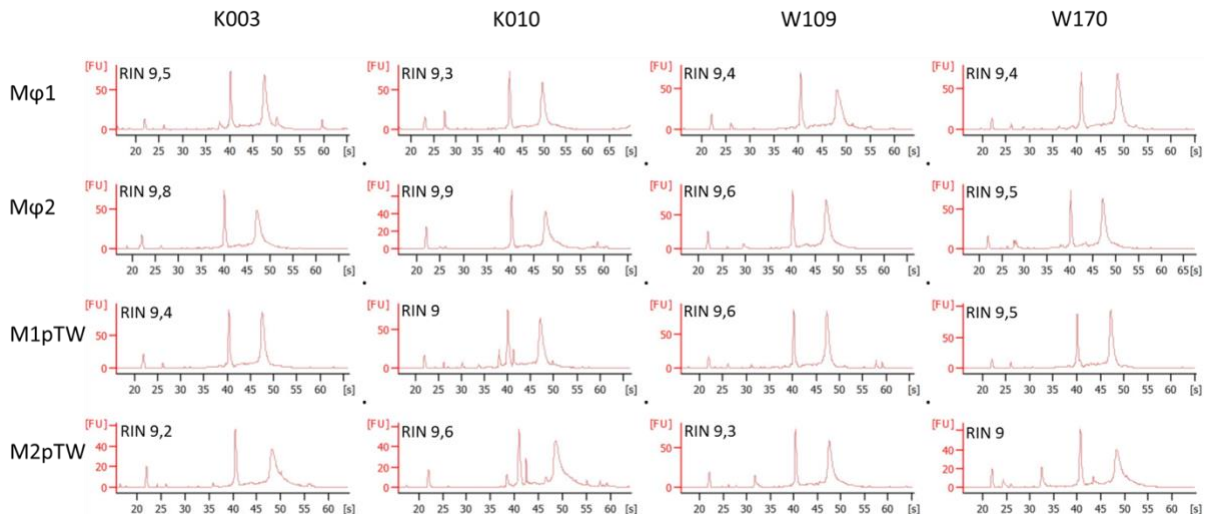


Abbildung 19: RIN-Werte der mRNA für Mikroarray-Analysen.

Die RNA wurde mittels RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Die Analyse der RNA-Integrität erfolgte unter Verwendung des 2100 Bioanalyzers. Dargestellt sind die Elektropherogramme und RIN-Werte der für die Mikroarray-Analysen verwendeten mRNA. Die Nummerierung der MW-Patienten und gesunden Kontrollen diente der Identifikation im Probenregister der AG Schneider/Moos.

Die aufgereinigte RNA wurde entsprechend dem Agilent-Verfahren der Firma Oaklabs, Hennigsdorf, Deutschland auf 16 Agilent 8x60 K Mikroarrays hybridisiert. Die Belegung der Agilent Chips und die durchgeführten Transkriptomanalysen sind in Anhang 4 visualisiert. Die Expressionswerte der prozessierten Agilent Chips wurden vor und nach erfolgter Quantil-Normalisierung als Boxplot abgebildet (Abbildung 20). Die Visualisierung verdeutlichte, dass sich die singulären Chips in ihrer Expression nicht unterschieden, wodurch auf eine homogene Datenqualität geschlossen wurde. Ausgehend von den normalisierten Daten wurden differenziell exprimierte Gene mittels HPCDA-Score Ranking identifiziert und unter Anwendung des Programms Genes@Work und der Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) weitergehend analysiert.

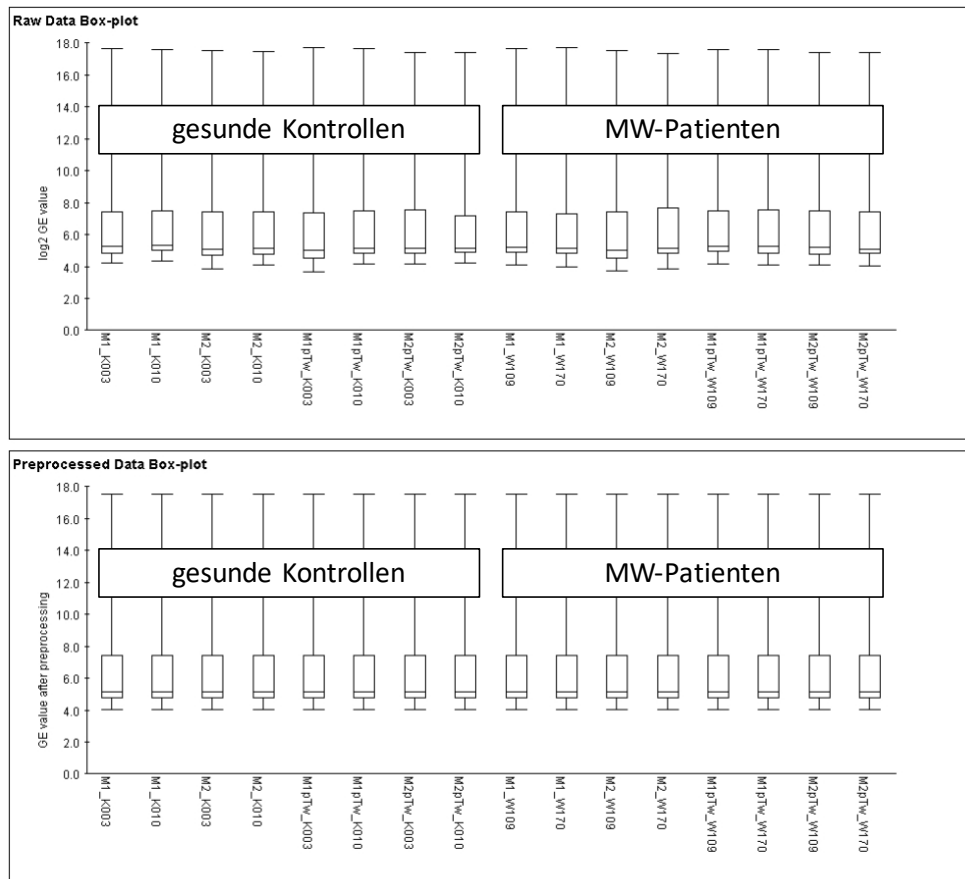


Abbildung 20: Expressionsintensitäten prozessierter Agilent Chips.

Expression der Agilent Chips vor (**oben**) und nach erfolgter Normalisierung (**unten**). Die Boxplots verdeutlichen die geringe Streuung der Fluoreszenzintensitäten zwischen den zu vergleichenden Chips. Die Normalisierung erfolgte durch Verwendung des Programms Expander 7. Die Nummerierung der MW-Patienten und gesunden Kontrollen diente der Identifikation im Probenregister der AG Schneider/Moos.

3.3.4 Vergleich des M ϕ -Transkriptoms von MW-Patienten und gesunden Kontrollen

Im ersten Schritt der Transkriptomanalyse wurden Unterschiede in der Genexpression der M ϕ von MW-Patienten und gesunden Kontrollen analysiert (Vergleiche 1-4). Zur Ermittlung der biologischen Relevanz der signifikanten IDs wurden diese nach absteigendem HPCDA-Score geranked.

Abbildung 21 visualisiert die Anzahl induzierter und reprimierter IDs aller acht Vergleiche.

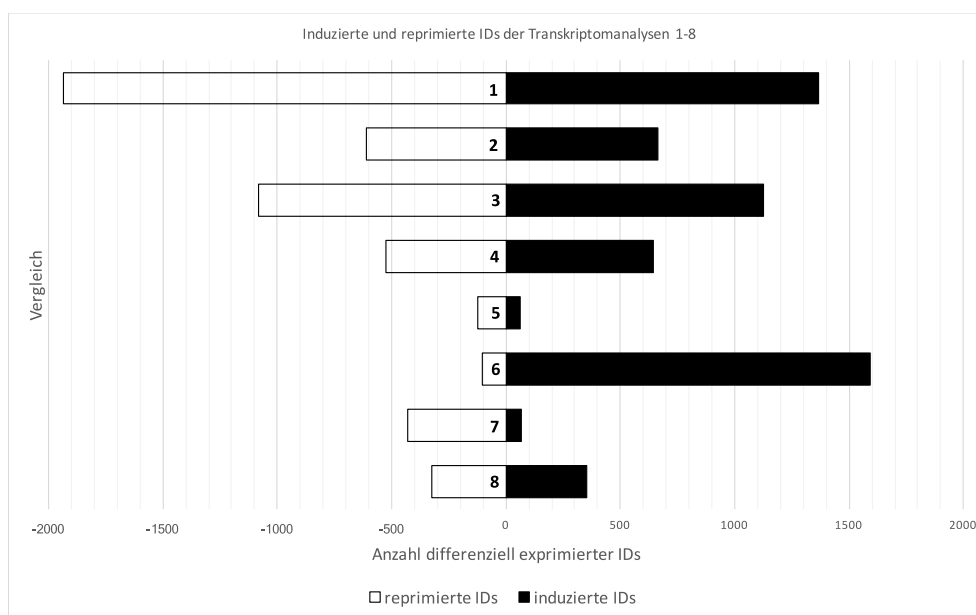


Abbildung 21: Induzierte und reprimierte IDs der Vergleiche 1-8.

Dargestellt ist die Anzahl differenziell exprimierter IDs von MW-Patienten und gesunden Kontrollen. Schwarze Balken repräsentieren in MW-Patienten induzierte, weiße Balken reprimierte IDs. Vergleich 1: M ϕ 1 MW-Patienten vs. Kontrollen (1364 induzierte, 1937 reprimierte IDs); Vergleich 2: M ϕ 2 MW-Patienten vs. Kontrollen (666 induzierte, 613 reprimierte IDs); Vergleich 3: M1pTW MW-Patienten vs. Kontrollen (1125 induzierte, 1080 reprimierte IDs); Vergleich 4: M2pTW MW-Patienten vs. Kontrollen (643 induzierte, 525 reprimierte IDs); Vergleich 5: M ϕ 1 vs. M1pTW Kontrollen (64 induzierte, 123 reprimierte IDs); Vergleich 6: M ϕ 1 vs. M1pTW MW-Patienten (1592 induzierte, 105 reprimierte IDs); Vergleich 7: M ϕ 2 vs. M2pTW Kontrollen (68 induzierte, 431 reprimierte IDs); Vergleich 8: M ϕ 2 vs. M2pTW MW-Patienten (351 induzierte, 325 reprimierte IDs).

Die größten Unterschiede im M ϕ -Transkriptom von MW-Patienten und gesunden Kontrollen wurden innerhalb der M ϕ 1 detektiert (3301 IDs, Vergleich 1). Eine detaillierte Analyse des Vergleichs verdeutlichte die stärksten Unterschiede in der Genexpression von GAPDH, TSEN54, Inc-KIDINS220-6, GUSB und IRF5 (Tabelle 23). GAPDH und IRF5 wurden von den M ϕ 1 der MW-Patienten vermehrt exprimiert, während die Expression von TSEN54, Inc-KIDINS220-6 und GUSB gegenüber Kontrollen vermindert vorlag. Die Top50 differentiell exprimierten Gene zwischen den M ϕ 1 von MW-Patienten und gesunden Kontrollen sind in Anhang 7 gelistet. Nach Infektion der M ϕ 1 mit *T. whipplei* (M1pTW, Vergleich 3) reduzierte sich die Anzahl der differenziell exprimierten IDs auf 2205. Die stärksten Unterschiede in der Genexpression ergaben sich für MT2A, CSTB, IRF5, CTSZ und GUSB. MT2A, CSTB, IRF5 und CTSZ wurden von den M1pTW der MW-Patienten vermehrt exprimiert, während GUSB vermindert exprimiert vorlag (Tabelle 23). Der Effekt der induzierten Genexpression von IRF5 in MW-Patienten verstärkte sich bei Präsenz intrazellulärer *T. whipplei* Bakterien. Der HPCDA-Score für die differenzielle GUSB-Expression war zwischen M ϕ 1 und M1pTW vergleichbar. Die GUSB-Repression unterlag keiner bakteriellen Modulation.

Innerhalb der M ϕ 2 ergab die Transkriptomanalyse rund 1270 signifikant unterschiedlich exprimierte IDs, womit die Anzahl gegenüber den M ϕ 1 um 50 % reduziert vorlag. Die Infektion mit *T. whipplei* beeinflusste die Anzahl der differenziell exprimierten IDs nur gering (1279 IDs in M ϕ 2 gegenüber 1168 IDs in M2pTW). Die M ϕ 2 von MW-Patienten wiesen gegenüber den gesunden Kontrollen die größten Unterschiede in der Genexpression von PLTP, NOP10, IRF5, HLA-DRB1 und A2M auf. NOP10 wurde von MW-Patienten reduziert exprimiert, während PLTP, IRF5, HLA-DRB1 sowie A2M in MW-Patienten erhöhte Expressionswerte aufwiesen (Vergleich 2, Tabelle 23). Die Analyse der M2pTW ergab die

höchsten Transkriptomdivergenzen in der Genexpression von PLTP und IRF5, welche in MW-Patienten induziert vorlagen, sowie für Inc-SYCP3-2, NOP10 und ZDHHC7, die gegenüber den Kontrollen weniger stark exprimiert wurden (Vergleich 4). PLTP, IRF5 und NOP10 wurden bereits innerhalb der Mφ2 als differenziell exprimierte IDs detektiert, sodass dieser Unterschied nicht auf eine Modulation durch *T. whipplei* zurückzuführen war. Auffällig war, dass sich – wie auch in den Mφ1 – die Unterschiede in der IRF5 Expression bei bestehender *T. whipplei* Infektion verstärkten (Tabelle 23).

Tabelle 23: Top 5 HPCDA-Scores der Vergleiche 1-4.

Dargestellt (schwarz) sind die HPCDA-Scores der fünf stärksten differenziell exprimierten Gene der Vergleiche 1-4. Grau unterlegte Werte repräsentieren die HPCDA-Scores, sofern das entsprechende Gen unter den Top25 der modulierten Gene nachgewiesen wurde. IRF5 und NOP10 waren über alle stark unterschiedlich exprimiert. Mφ1: Mφ1 (+10 ng TNF-α); Mφ2: Mφ2 (+10 ng IL-10); M1pTW: *T. whipplei* infizierte Mφ1; M2pTW: *T. whipplei* infizierte Mφ2; K: gesunde Kontrolle; MW: MW-Patient; ↑: Gen in MW-Patienten hochreguliert; ↓: Gen in MW-Patienten herunterreguliert.

Gensymbol	Funktion	Vergleich			
		Mφ1 MW vs. K (Vergleich 1)	Mφ2 MW vs. K (Vergleich 2)	M1pTW MW vs. K (Vergleich 3)	M2pTW MW vs. K (Vergleich 4)
Gesamtzahl differenziell exprimierter IDs		3301	1279	2205	1168
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	2144,88 ↑			
TSEN54	TRNA Splicing Endonuklease Subunit 54	2073,86 ↓			
Inc-KIDINS220-6	Nicht kodierende RNA	1948,86 ↓			
GUSB	β-Glukuronidase	1919,66 ↓		1954,47 ↓	
IRF5	Interferon regulatorischer Faktor 5	1869,66 ↑	1546,02 ↑	2517,71 ↑	2003,82 ↑
PLTP	Phospholipid-Transferprotein		2542,47 ↑		2909,53 ↑
NOP10	Ribonukleoprotein	(1588,79 ↓)	1988,99 ↓	(1572,37 ↓)	1920,44 ↓
HLA-DRB1	HLA Klasse-II Histokompatibilitätsantigen		1212,81 ↑	(1510,88 ↑)	
A2M	α-2-Makroglobulin		1077,08 ↑	(1575,98 ↑)	(1114,90 ↑)
MT2A	Metallothionin 2A			3130,40 ↑	(1215,36 ↑)
CSTB	Zystatin B			3059,49 ↑	
CTS2	Cathepsin Z			2098,78 ↑	
Inc-SYCP3-2	Nicht kodierende RNA				1998,69 ↓
ZDHHC7	Zink-Finger, DHHC-Typ 7				1552,26 ↓

3.3.5 Einfluss von *T. whipplei* auf die Genexpression der Mφ

Neben den basalen Transkriptom-Unterschieden zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen wurden die Datensätze nachfolgend auf Unterschiede analysiert, die aus einer *T. whipplei* Infektion resultierten. Hierbei zeigte sich, dass *T. whipplei* eine weniger starke Variation der Genexpression induzierte als Unterschiede zwischen MW-Patienten und Kontrollen existierten (Abbildung 21). Der überwiegende Teil der im Zuge einer *T. whipplei* Infektion modulierten Gene war nicht kodierend oder nicht charakterisiert.

Die Mφ1 Infektion gesunder Kontrollen mit *T. whipplei* resultierte in einer differenziellen Geneexpression von 187 IDs (Vergleich 5). Diese verhältnismäßig geringe Anzahl modulierter IDs sprach für eine marginale *T. whipplei* induzierte Modifikation. Bestätigt wurde dies durch HPCDA-Scores ≤ 1000 , womit die Expressionsunterschiede weniger ausgeprägt waren als die Unterschiede zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen (Tabelle 23 und Tabelle 24). Die stärksten Unterschiede wurden für die Genexpression von UFT1, N6AMT1, OR11A1, RPPH1 und AMOTL1 detektiert, wobei die Expression von N6AMT1 und RPPH1 bei Präsenz intrazellulärer *T. whipplei* induziert und die Expression von UFT1, OR11A1 und AMOTL1 vermindert vorlag. Innerhalb der Mφ1 gesunder Kontrollen wurden 65 % der differenziell exprimierten Gene durch *T. whipplei* reprimiert. Die Beobachtung der Genrepression wurde ebenfalls durch die Reduktion von 86 % der signifikanten IDs innerhalb der M2pTW gegenüber Mφ2 bestätigt (Vergleich 7). Hierbei zeigten sich die Top 5 modulierten IDs Inc-TAR12-3, Inc-ZKSCAN1-1, TPSG1, THC2753069 und PBX3 vermindert exprimiert.

Das Mφ-Transkriptom der MW-Patienten unterlag nach *T. whipplei* Infektion einer stärkeren Modulation als sie für gesunde Kontrollen nachgewiesen wurde. Die Analyse der M1pTW gegenüber den Mφ1 (Vergleich 6) offerierte für die MW-Patienten 1697 differenziell exprimierte IDs. Die Gene GS1-24F4.1, HBZ und THC2688744 wiesen HPCDA-Scores > 2000 auf, womit diese deutlich stärker moduliert wurden als die Gene der Kontrollgruppe. Die HPCDA Score-Visualisierung verdeutlichte ein Ungleichgewicht induzierter und reprimierter Gene (Abbildung 21, Anhang 6.B). Während 1591 IDs innerhalb der M1pTW verstärkt exprimiert wurden, wurde für 106 IDs eine Expressionsrepression nachgewiesen. Die Verschiebung in Richtung Geninduktion war einzigartig für die M1pTW-Zellpopulation der MW-Patienten. Die Analyse des Einflusses von *T. whipplei* auf die Genexpression von Mφ2 von MW-Patienten ergab 676 signifikante IDs, von denen 325 IDs vermindert und 351 IDs verstärkt exprimiert wurden (Abbildung 21, Anhang 6.D). Innerhalb der Mφ2 existierte somit ein Gleichgewicht induzierter und reprimierter Gene, wobei die am stärksten modulierten IDs Inc-DTYMK-3, ENST00000425409, DUX4, A_33_P3341522 und CALY vermindert exprimiert vorlagen (Tabelle 24).

Tabelle 24: Top 5 HPCDA-Scores der Vergleiche 5-8.

Dargestellt sind die HPCDA-Scores der 5 stärksten differenziell exprimierten Gene der Vergleiche 5-8. M1: Mφ1 (+10 ng TNF- α); M2: Mφ2 (+10 ng IL-10); M1pTW: *T. whipplei* infizierte Mφ1; M2pTW: *T. whipplei* infizierte Mφ2; K: gesunde Kontrolle; MW: MW-Patient; \uparrow : Gen in MW-Patienten hochreguliert; \downarrow : Gen in MW-Patienten herunterreguliert.

Gensymbol	Funktion	Vergleich			
		M1pTW vs. Mφ1 K (Vergleich 5)	M1pTW vs. Mφ1 MW (Vergleich 6)	M2pTW vs. Mφ2 K (Vergleich 7)	M2pTW vs. Mφ2 MW (Vergleich 8)
Gesamtzahl differenziell exprimierter IDs		187	1697	499	676
UTF1	Undifferenzierter Stammzell-Transkriptionsfaktor 1	986,73 ↓			
N6AMT1	N-6 Adenine-spezifische DNA Methyltransferase 1	956,50 ↑			
OR11A1	Olfaktorischer Rezeptor	834,02 ↓			
RPPH1	Ribonuklease P	821,27 ↑			
AMOTL1	Angiomotin like 1	755,65 ↓			
GS1-24F4.2	Uncharakterisiert		2404,05 ↑		
Inc-CMTM4-1	Nicht kodierende RNA		2374,44 ↑		

Gensymbol	Funktion	Vergleich			
		M1pTW vs. Mφ1 K (Vergleich 5)	M1pTW vs. Mφ1 MW (Vergleich 6)	M2pTW vs. Mφ2 K (Vergleich 7)	M2pTW vs. Mφ2 MW (Vergleich 8)
HBZ	Hämoglobin zeta		2300,96 ↑		
THC2688744	Trankriptionsprotein ICPO		2089,17 ↑		
KCNK15	Kaliumkanal		1960,63 ↑		
lnc-TAF12-3	Nicht kodierende RNA			1499,42 ↓	
lnc-ZKSCAN1-1	Nicht kodierende RNA			1216,96 ↓	
TPSG1	Tryptase-γ1			1096,45 ↓	
THC2753069	Q39AC8_BURS3			1056,44 ↓	
PBX3	Pre-B-Zell leukemia homeobox 3			945,15 ↓	
lnc-DTYMK-3	Nicht kodierende RNA				2553,18 ↓
ENST00000425409	Double Homeobox 4				2099,70 ↓
DUX4	Double Homeobox 4				1632,66 ↓
A_33_P3347522	Unbekannt				1269,00 ↓
CALY	Calcyon-Neuronen- spezifisches vesikuläres Protein				1254,89 ↓

3.3.6 Analyse übereinstimmender IDs der Vergleiche 1-4 und 5-8

Zur Ermittlung global unterschiedlicher IDs zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen wurde eine Schnittmengenanalyse der Vergleiche 1-4 durchgeführt. Diese Analyse offerierte 138 IDs, die sich signifikant zwischen beiden Gruppen unabhängig vom Mφ-Subtyp und der Präsenz von *T. whipplei* Bakterien in ihrer Expression unterschieden (Abbildung 22.A; Anhang 8). Diese 138 IDs kodierten für 105 Gene, von denen die 20 Gene mit dem höchsten Average HPCDA-Score in Tabelle 25 dargestellt sind. Die Expressionswerte der Gene IRF5, NOP10, des Hitzeschockproteins HSPA1A und des Transkriptionsfaktors STAT6 wurden in Abbildung 23 visualisiert.

Zur Identifikation potentiell *T. whipplei* modulierter Gene wurde die Schnittmenge der Vergleiche 5-8 analysiert. Hierbei wurde kein Gen identifiziert, das nach erfolgter *T. whipplei* Infektion sowohl in M1pTW und M2pTW von MW-Patienten als auch gesunden Kontrollen verändert vorlag (Abbildung 22.B).

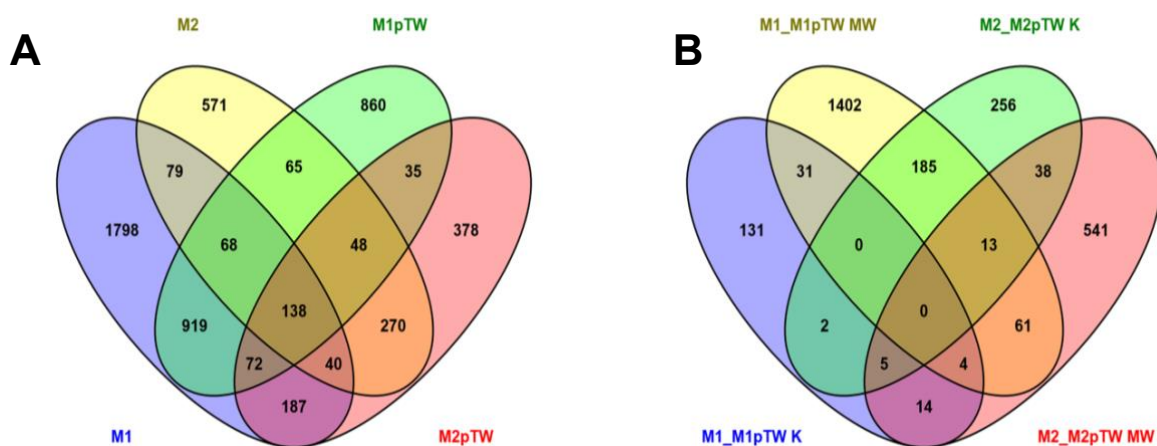


Abbildung 22: Venn-Diagramme der Vergleiche 1-4 und 5-8.

Gesunde Kontrollen und MW-Patienten unterschieden sich unabhängig vom M ϕ -Subtyp und dem Vorliegen einer *T. whipplei* Infektion in der Expression von 138 IDs. Signifikante IDs des M1 Vergleichs sind blau, des M2 Vergleichs gelb, des M1pTW Vergleichs grün und des M2pTW Vergleichs rot hinterlegt (**A**). Es wurde kein Gen identifiziert, das in allen durchgeführten Vergleichen durch *T. whipplei* moduliert wurde. Signifikante IDs des M1 vs. M1pTW Vergleichs der Kontrollen sind blau und signifikante IDs des M2 vs. M2pTW Vergleichs grün dargestellt. Die äquivalenten Vergleiche der MW-Patienten sind gelb und rot hinterlegt (**B**). Schnittmengen ergeben sich als Mischfarben der Primärvergleiche. Die Erstellung der Venn-Diagramme erfolgte durch Nutzung der Webseite <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

Tabelle 25: Top 20 aller 138 signifikanten IDs der Vergleiche 1-4.

Das Ranking erfolgte absteigend nach dem HPCDA-Score. AvgSign: Average Sign, durchschnittlicher Signalwert aller vier Einzelvergleiche; \uparrow : Gen in MW-Patienten hochreguliert; \downarrow : Gen in MW-Patienten herunterreguliert.

Gensymbol	Funktion	AvgSign HPCDA-Score
IRF5	Interferon regulatorischer Faktor 5	1984,30 \uparrow
NOP10	Ribonukleoprotein	1767,65 \downarrow
PIH1D1	PIH1 Domäne (PIH1D1)	869,97 \downarrow
HSPA1A	Hitzeschockprotein 70kDa, 1A	857,55 \uparrow
ST6GAL1	ST6- β -Galaktosamid α -2,6-Sialyltransferase 1	839,46 \uparrow
B3GALTL	β -1,3-Glaktosyltransferase	791,47 \uparrow
CSRP2	Cystein- und Glycinreiches Protein 2	786,05 \uparrow
CBS	Cystathionin- β -Synthase	765,99 \downarrow
STAT6	Transkriptionsfaktor, IL-4 induziert	724,00 \uparrow
PPIL3	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase-like 3	719,49 \downarrow
MMP12	Matrix Metalloproteinase 12	717,12 \uparrow
LINC00649	Nicht kodierende RNA	703,82 \downarrow
EMILIN1	Elastin Mikrofibril Interfacer 1	693,14 \downarrow
LOC100132077	Unbekannt	649,47 \uparrow
AK090765	Homo sapiens cDNA FLJ33446 fis	648,71 \uparrow
TMEM114	Transmembranprotein 114	638,26 \downarrow

3 Ergebnisse

Gensymbol	Funktion	AvgSign HPCDA-Score
MTERF4	Mitochondrialer Transkription Termination Faktor 4	632,31 ↑
SIRPB2	Signalregulatorisches Protein β 2	626,90 ↑
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	619,30 ↑

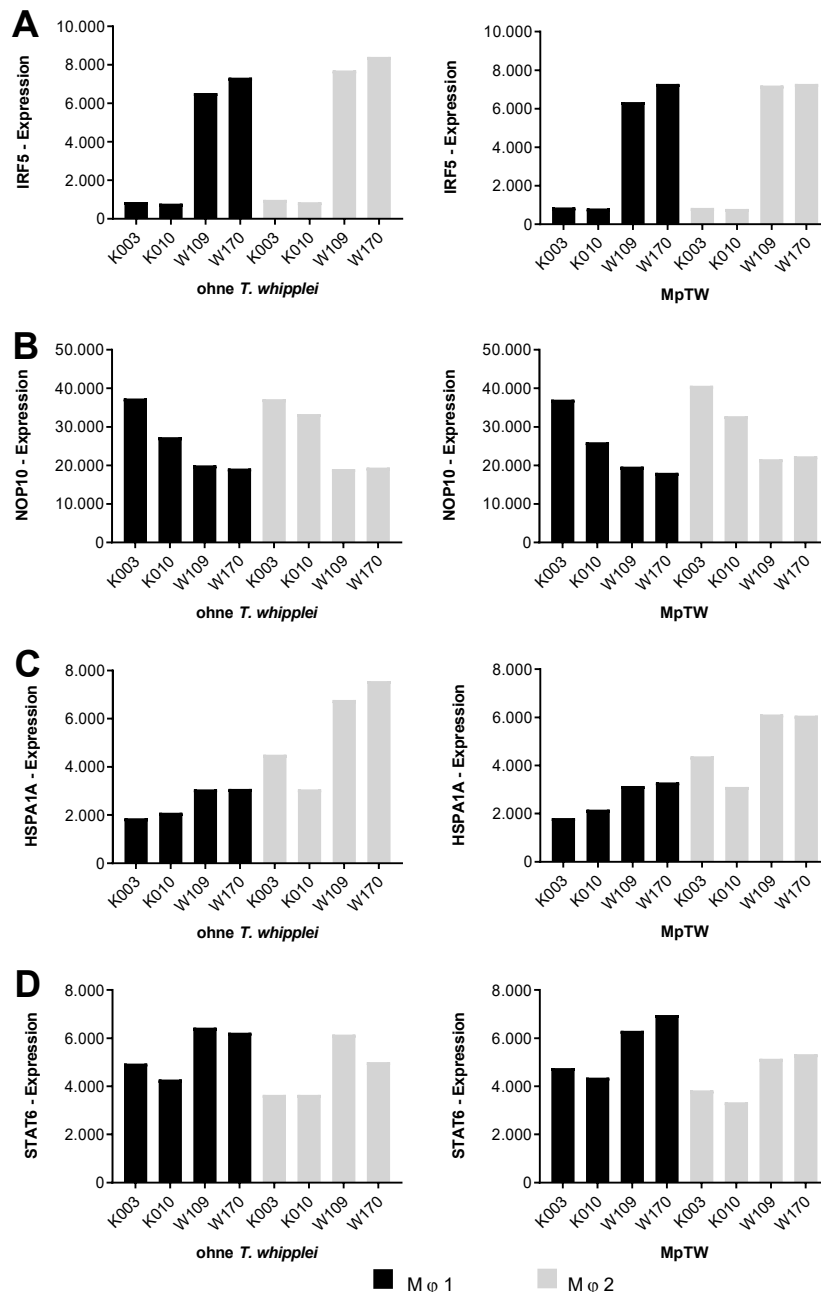


Abbildung 23: Expressionswerte von IRF5, NOP10, HSPA1A und STAT6.

Dargestellt sind die normalisierten Expressionswerte *in vitro* differenzierter Mφ 1 (schwarze Balken) und Mφ 2 (graue Balken) für IRF5 (A), NOP10 (B), HSPA1A (C) und STAT6 (D). Linkstehende Graphen visualisieren die Expressionswerte *in vitro* differenzierter Mφ ohne *T. whipplei* Infektion. Die Expressionswerte unter bestehender *T. whipplei* Infektion sind den rechtsstehenden Graphen zu entnehmen. IRF5, HSPA1A und STAT6 wurden von MW-Patienten verstärkt exprimiert. NOP10 lag bei MW-Patienten vermindert exprimiert vor. MpTW: *T. whipplei* infizierte Makrophagen K: gesunde Kontrolle; W: MW-Patient. Die Nummerierung der Patienten und Kontrollen diente der Identifikation im Probenregister der AG Schneider/Moos.

3.3.7 Funktionelle Annotation differenziell exprimierter Gene

Differenziell exprimierte Gene wurden mithilfe der Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) in biologisch zusammenhängende, funktionelle Gruppen geclustert [190, 194]. Die Software ordnete die Gene in funktionelle Kategorien und prüfte, ob im angegebenen Datensatz eine Kategorie überrepräsentiert war, d.h. ob signifikant mehr Gene für eine funktionelle Kategorie erhalten waren als durch eine Zufallsverteilung zu erwarten war. Redundante Kategorien wurden anschließend zu sogenannten Annotationsclustern zusammengefasst. Aus den p-Werten der funktionellen Kategorien eines Annotationsclusters wurde ein Enrichment-Score berechnet, wobei ein Score von 1,3 etwa einem p-Wert = 0,05 entsprach.

Basierend auf einem Enrichment-Score von $> 1,3$ ergaben sich für die durchgeführten Vergleiche 5 (Vergleich 8) bis 23 (Vergleich 3) Annotationscluster (Abbildung 24). Die in Tabelle 26 visualisierten Annotationscluster entstanden für mehrere Vergleiche und besaßen eine vermehrte biologische Relevanz. Das Annotationscluster „Glykoprotein“ mit den UP_Keywords *Glycoproteine*, *Disulfid Bond* und *Signal* zeigte sich in den Vergleichen 1-6 überrepräsentiert. Durch Überlappungen funktioneller Gruppen ergab sich ebenso das Annotationscluster „Membran“ mit den UP_Keywords *Glycoprotein cell membran*, *Membrane*, *Transmembrane helix* und *Transmembran*. Im immunologischen Kontext einer *T. whipplei* Infektion scheinen die Annotationscluster „Immunität“ (*Immunity*, *innate Immunity*), „MHC-Komplexe“ (*MHC I*, *MHC II*) und „Interferon Signaling“ (*Immunity*, *innate immunity*, *antiviral defense*) von besonderem Interesse. Die Auflistung aller gebildeten Annotationscluster der Vergleiche 1-8 ist Anhang 9 zu entnehmen.

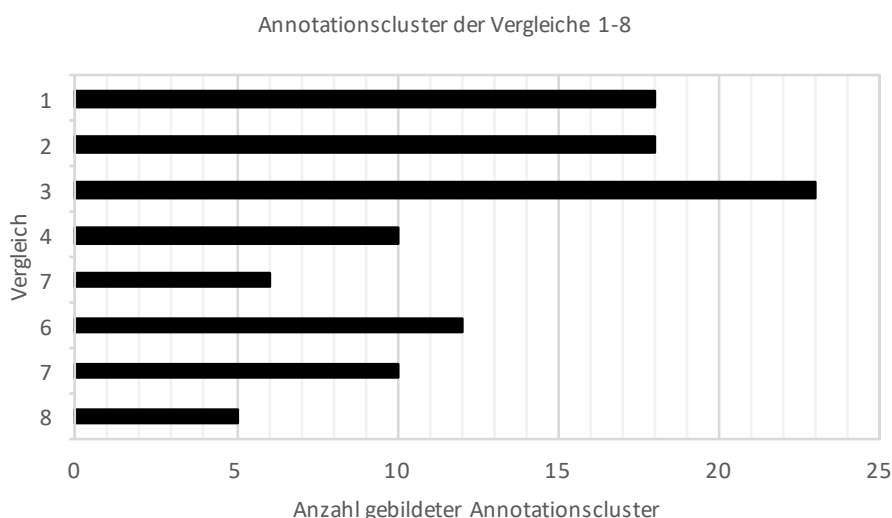


Abbildung 24: Annotationscluster der Vergleiche 1-8.

Dargestellt ist die Anzahl der gebildeten Annotationscluster mit einem Enrichment-Score $> 1,3$ ($p=0,05$) für die Transkriptomanalysen 1-8. Vergleich 1: M ϕ 1 MW-Patienten vs. Kontrollen; Vergleich 2: M ϕ 2 MW-Patienten vs. Kontrollen; Vergleich 3: M1pTW MW-Patienten vs. Kontrollen; Vergleich 4: M2pTW MW-Patienten vs. Kontrollen; Vergleich 5: M ϕ 1 vs. M1pTW; Vergleich 6: M ϕ 1 vs. M1pTW MW-Patienten; Vergleich 7: M ϕ 2 vs. M2pTW Kontrollen; Vergleich 8: M ϕ 2 vs. M2pTW MW-Patienten; K: gesunde Kontrollen; MW: MW-Patienten.

3.3.8 Analyse der Genexpression von IRF4

Da eine Bedeutung des Interferon regulatorischen Faktors 4 (IRF4) für die Pathogenese des MW postuliert wurde [170], wurde dessen Expression nachfolgend analysiert. IRF4 wurde von den

analysierten M ϕ -Populationen nur gering exprimiert. Es wurde kein Unterschied zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen detektiert (Abbildung 25).

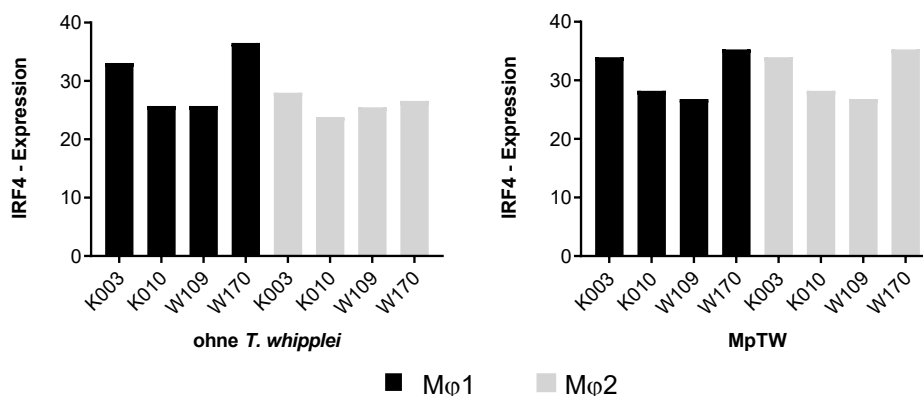


Abbildung 25: Keine Unterschiede in der IRF4 Expression zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen.

Dargestellt sind die normalisierten Expressionswerte *in vitro* differenzierter M ϕ 1 (schwarze Balken) und M ϕ 2 (graue Balken). Linkstehend sind die IRF4 Expressionswerte *in vitro* differenzierter M ϕ ohne *T. whipplei* Infektion darstellt, rechtsstehend die Expressionswerte unter bestehender *T. whipplei* Infektion. K: gesunde Kontrolle; W: MW-Patient. Die Nummerierung der Patienten und Kontrollen diente der Identifikation im Probenregister der AG Schneider/Moos.

3.4 Analyse der systemischen *T. whipplei* Verbreitung durch Monozyten

Bisher ist nicht geklärt, wie die systemische Verbreitung der Pathogene erfolgt. Die Ergebnisse der vorhergehenden Experimente wiesen darauf hin, dass die Monozyten und M ϕ von MW-Patienten für eine *T. whipplei* Infektion empfänglicher sind und im Zuge einer Infektion langsamer differenzieren. Diese verlangsamte Differenzierung könnte darin resultieren, dass infizierte Monozyten vor ihrer Migration und Differenzierung längere Zeit im peripheren Blut zirkulieren und somit die Verbreitung der Bakterien ermöglichen. Diese Infektionsroute würde das Vorkommen isolierter Infektionen, z.B. einer *T. whipplei* assoziierten Endokarditis oder isolierter Gelenksbeschwerden, erklären. Zur Überprüfung der Hypothese und zur Erlangung weiterer Kenntnisse über die systemische Ausbreitung von *T. whipplei* wurde die Suszeptibilität verschiedener Blutfraktionen sowie deren Beteiligung an der Zirkulation der Bakterien innerhalb des Blutstroms in einer prospektiven Pilotstudie untersucht.

3.4.1 Bestätigung einer chronischen *T. whipplei* Infektion durch die standardisierte Diagnostik aus duodenalen Biopsien

In die prospektive Pilotstudie wurden 20 MW-Patienten und 18 Individuen mit dem Verdacht einer *T. whipplei* Infektion inkludiert (Abbildung 5). Die Bestätigung der MW-Patienten erfolgte anhand von mindestens zwei unabhängigen, positiven Befunden der PAS-Färbung, der *T. whipplei* spezifischen IHC oder der PCR [173]. 38,9% der MW-Patienten wiesen die charakteristischen PAS⁺ M ϕ in der duodenalen Lamina propria auf. Die *T. whipplei*-spezifische IHC ermöglichte den Nachweis der Bakterien in allen MW-Patienten (100%), wobei 10 Patienten lediglich eine schwache Färbung in der Submukosa aufwiesen. Mithilfe der *rpoB* RT-PCR wurde in allen analysierten Biopsien (100%) bakterielle DNA nachgewiesen und die Diagnose des MW bestätigt (Tabelle 27, Abbildung 27).

Das analysierte Probenmaterial der inkludierten Verdachtsfälle war für alle Nachweismethoden negativ, sodass eine *T. whipplei* Infektion ausgeschlossen wurde. Die Verdachtsfälle dienten im Weiteren als Kontrollpopulation.

3 Ergebnisse

Tabelle 26: Funktionelle Annotationscluster der Vergleiche 1-8.

Aufgelistet sind die wiederkehrenden Annotationscluster mit den dazugehörigen statistischen Parametern. Das Ranking innerhalb der Cluster erfolgte nach absteigendem Enrichment Score.

Cluster	Bezeichnung	Vergleich	Enrichment Score	Count	%	PValue	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
1	Glykoproteine	1	8,268	270	28,067	4,23E-11	1,431444025	1,94E-08	1,94E-08	6,01E-08
		3	6,542	372	25,306	1,19E-06	1,241547334	5,96E-04	6,63E-05	0,001718422
		4	4,711	184	27,139	7,62E-07	1,384531969	2,87E-04	1,44E-04	0,00105416
		6	4,271	221	25,315	4,19E-07	1,352407194	1,76E-04	8,81E-05	5,89E-04
		2	3,589	211	25,422	3,34E-05	1,284260954	0,013878632	0,003487863	0,046923007
		5	2,830	30	30,303	0,012431529	1,524371727	0,899915286	0,318611773	14,32853094
2	Immunität	3	8,281	85	5,782	1,35E-15	2,582118081	6,66E-13	6,66E-13	1,92E-12
		1	4,246	48	4,990	1,53E-07	2,316267292	7,05E-05	1,17E-05	2,18E-04
		2	3,903	42	5,060	9,54E-07	2,326788694	3,99E-04	1,99E-04	0,001338613
		7	1,532	15	4,717	0,006149159	2,29527881	0,831798635	0,11955525	7,868692189
		5	1,340	6	6,061	0,063189147	2,774966292	0,999993919	0,603022822	55,37876476
3	Membran	1	4,562	375	38,981	2,74E-06	1,207355099	0,001258049	1,57E-04	0,003894538
		3	4,556	594	40,408	4,59E-09	1,203926388	2,30E-06	7,66E-07	6,61E-06
		4	3,688	252	37,168	0,003106042	1,151539534	0,690500956	0,063078306	4,210451955
		2	2,669	309	37,229	0,00204882	1,142148173	0,575687659	0,068948283	2,837910299
		6	2,637	293	33,562	0,039578933	1,088869833	0,999999957	0,492593316	43,29281846
4	Interferon I Signaling	8	3,490	9	1,829	1,04E-04	6,101744186	0,185758425	0,050077185	0,178792134
		2	2,908	10	1,205	7,09E-04	4,067829457	0,849760023	0,849760023	1,253010642
		7	2,106	6	1,887	0,002118318	6,586820084	0,958006654	0,652415693	3,460672604
		1	1,933	9	0,834	0,01551779668	2,758615654	1	0,704841101	24,80779722
		4	1,655	7	1,032	0,01373548	3,545608108	1	0,905754795	21,39155552
5	Metallothionin	4	5,992	8	1,180	4,97E-08	19,56833848	1,87E-05	1,87E-05	6,87E-05
		8	3,712	6	1,220	7,62E-06	19,91067398	0,002838088	0,001420052	0,010519219
		3	1,636	5	0,340	0,010955562	5,424617818	0,995945824	0,100506299	14,66924128
6	MHC-Komplexe	3	4,465	11	0,748	1,51E-05	5,418154762	0,01887761	0,009483776	0,024496069
		1	3,609	13	1,351	8,43E-10	10,45014286	8,34E-07	8,34E-07	1,33E-06
		2	1,963	8	0,964	7,73E-05	7,307792208	0,067461287	0,067461287	0,120544029
7.a	Cadherine	6	5,143	17	1,947	3,87E-06	4,076002842	0,004643256	0,002324329	0,006260739
		1	3,975	17	1,767	2,71E-05	3,485720283	0,036112405	0,004587022	0,044536677
		2	1,90	10	1,204	7,31E-04	4,055725524	0,608241194	0,374093613	1,184391758
7.b	Procadherine	2	2,134	3	0,361	0,007353571	20,86997226	0,999999687	0,712910269	11,93649123
		6	2,122	3	0,344	0,00755427	20,58447332	0,999999922	0,64056574	12,32554608

3.4.2 Nachweis von *T. whipplei* Bakterien in Fraktionen des peripheren Blutes

Da *T. whipplei* Bakterien bereits in zirkulierenden Monozyten nachgewiesen wurden [195], wurde die Suszeptibilität von EDTA-Blut, PBMC, aufgereinigten CD14⁺ Monozyten sowie einer CD14⁺ depletierten Zellfraktion mittels *rpoB* RT-PCR [168] auf die Präsenz von *T. whipplei* DNA analysiert.

Insgesamt wurde in den Blutproben von 16 der 20 bestätigten MW-Patienten (80 %) *T. whipplei* DNA nachgewiesen (Tabelle 27). Die Aufschlüsselung der einzelnen Blutfraktionen zeigte für EDTA-Vollblut eine Testsensitivität und einen negativen prädiktiven Wert (NPW), d.h. die Wahrscheinlichkeit bei negativem Testergebnis nicht erkrankt zu sein, von 41,2 %. Die Aufreinigung von PBMC optimierte die Sensitivität und den NPW der *rpoB* RT-PCR. Nach erfolgter Aufreinigung der PBMC wurde in 61,1 % der MW-Patienten *T. whipplei* DNA amplifiziert. Der NPW der PBMC-Analyse betrug 70,8 %. Eine Zwischenauswertung nach 15 MW-Patienten verdeutlichte, dass eine weitergehende Aufreinigung von CD14⁺ Monozyten aus PBMC keinen diagnostischen Vorteil brachte. Sowohl die Sensitivität (60 %) als auch der NPW (68,4 %) aufgereinigter CD14⁺ Monozyten war mit der Analyse der PBMC vergleichbar, sodass für die nachfolgenden Patienten lediglich PBMC als Ausgangsmaterial untersucht wurden.

Die *rpoB* RT-PCR aus den CD14⁺ depletierten Zellen zeigte mit einer Sensitivität von 80 % und einem NPW von 77,8 % die besten Testergebnisse. Aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufwands sowie eines verstärkten Kontaminationsrisikos bei der Aufarbeitung der CD14⁺ depletierten Zellfraktion wurde jedoch, konsistent zu den CD14⁺ Monozyten, auf eine weiterführende Analyse verzichtet. Diese Entscheidung wurde durch die Analyse des *Cycle Thresholds* (CT) der einzelnen Blutfraktionen gestützt. Während die Aufreinigung von PBMC (33,22±2,42) gegenüber den EDTA-Vollblutproben (38,14±1,87) in signifikant verminderten CT-Werten der *rpoB* RT-PCR resultierte ($p=0,0015$), wurde für die separierten CD14-Fraktionen keine weitere Reduktion des CT-Werts nachgewiesen (Abbildung 26). Gegenteilig zeigten sowohl die aufgereinigten CD14⁺ Monozyten (35,22±2,65) als auch die CD14⁺ depletierte Zellfraktion (34,76±3,68) gegenüber den PBMC einen geringfügig erhöhten CT-Wert, welcher die Entscheidung für PBMC als präferiertes Untersuchungsmaterial bekräftigte.

Die *rpoB* RT-PCR CT-Werte von MW-Patienten, die vor Studieneinschluss eine Antibiotikatherapie von <14 Tagen erhielten (Patienten 12-14 und 17), unterschieden sich nicht von den unbehandelten Patienten (Abbildung 26). Hingegen wurde in keiner der im Zuge einer 3-monatigen Follow-Up Untersuchung analysierten Blutproben *T. whipplei* DNA detektiert (Patienten 1, 3, 5, 10, 13 und 17; Tabelle 27). Die *rpoB* RT-PCR war für alle analysierten Blutfraktionen der 18 Kontrollen negativ (Tabelle 27). Basierend auf diesen Testergebnissen betrug die Spezifität und der positive prädiktive Wert (PPW) der *rpoB* RT-PCR aus Fraktionen des Blutes, d.h. die Wahrscheinlichkeit bei positivem Testergebnis an MW erkrankt zu sein, 100 %.

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie verdeutlichten, dass monozytäre Zellen des peripheren Blutes für eine *T. whipplei* Infektion suszeptibel sind und die Verbreitung der Erreger in MW-Patienten ermöglichen. Die *rpoB* RT-PCR Analyse der Blutproben könnte aufgrund einer Sensitivität von 80 % als unterstützendes, minimal-invasiv gewonnenes Ausgangsmaterial der MW-Diagnostik, vor allem bei lokalisierten Infektionen ohne gastrointestinale Beteiligung, Anwendung finden.

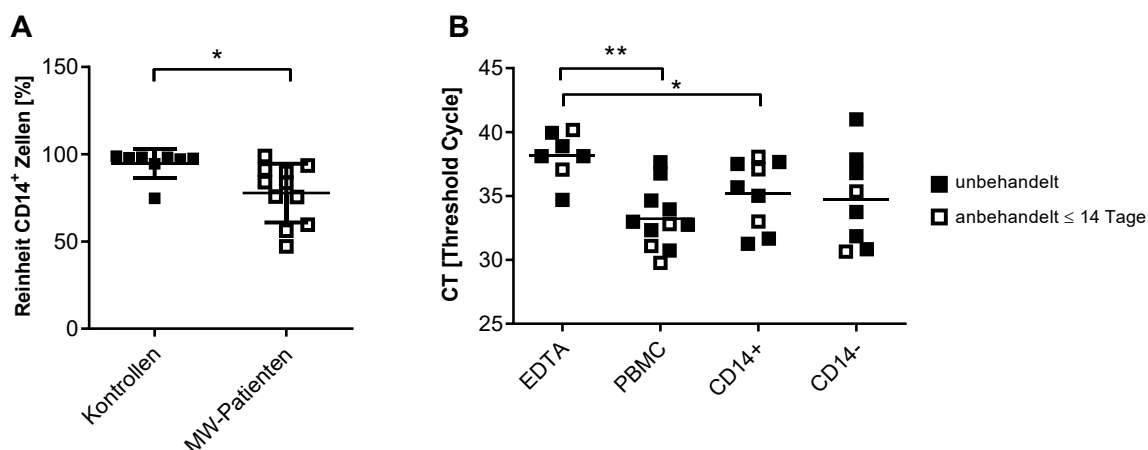


Abbildung 26: CT-Wert basierte Entscheidung für PBMC als präferiertes Untersuchungsmaterial.

Zur Analyse von Blut als diagnostisches Material wurden aus humanem Vollblut PBMC gewonnen und diese mittels MACS Aufreinigung in eine CD14⁺ angereicherte und eine CD14⁺ depletierte Fraktion (CD14⁻) getrennt. MW-Patienten wiesen im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine verminderte Reinheit der CD14⁺ Monozyten-Fraktion auf (Kontrollen n=8, MW-Patienten n=11) **(A)**. Die *rpoB* RT-PCR zum Nachweis intrazellulärer *T. whipplei* Bakterien ergab die geringsten CT-Werte für PBMC, wodurch die Entscheidung für PBMC als diagnostisches Material gegenüber Vollblut und der separierten CD14⁻ Fraktion bekräftigt wurde **(B)**. MW: Morbus Whipple, PBMC: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*), CD: Cluster of differentiation, CD14⁺: Fraktion aufgereinigter Monozyten, CD14⁻: um CD14⁺ Monozyten depletierte Zellfraktion. Mann-Whitney U Test. * p<0,05; ** p<0,01.

3 Ergebnisse

Tabelle 27: Charakterisierung der Patientenpopulation und Zusammenfassung der PCR- und Histologie-Ergebnisse.

Nr.: Nummer, M: männlich, W: weiblich, CWD: klassischer Morbus Whipple, Duo: Duodenum, PAS: periodic-acid Schiff, TW: *T. whipplei*, IHC: Immunhistochemie, PBMC: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, PCR: Polymerasekettenreaktion, CD: *cluster of differentiation*, PPW: positiver prädiktiver Wert, NPW: negativer prädiktiver Wert, TMP/SMX: Trimethoprim/Sulfamethoxazol, PPI: Protonenpumpeninhibitoren, ¹: vereinzelt in der Submukosa, ²: Verwendung getauter PBMC für die *rpoB* RT-PCR, ³: <2x10⁶ Zellen für *rpoB* RT-PCR eingesetzt, nd: nicht durchgeführt, -: negativ, +: positiv, # zusätzliche Daten der Follow-Up Untersuchung nach 3 Monaten verfügbar. Nachgedruckt und übersetzt mit Genehmigung von Molecular Diagnosis & Therapy [175].

Nr.	Geschlecht	Alter	klinische Symptome	Diagnose	Behandlung	Follow-Up (Monate)	Histologie			PCR							
							Duo PAS	Duo TW IHC	anderes Material	Duo	Liquor	anderes Material	EDTA Blut	PBMC	CD14 ⁺	CD14 ⁻	Zs.fassende Ergebnisse
MW-Pat	M (55%)	58,9	Sensitivität (%)				38,9 (7/18)	100 (16/16)		100 (12/12)	53,3 (8/15)		41,2 (7/17)	61,1 (11/18)	60 (9/15)	80 (8/10)	80 (16/20)
	W (45%)		Spezifität (%)				100	100		100	100		100	100	100	100	
Kont	M (50%)	PPW (%)	100				100	100		100	100		100	100	100		
	W (50%)	NPW (%)	62,1				100	100		41,70	41,20		70,80	68,40	77,80	81,80	
MW-Patienten (n=20)																	
1 [#]	W	37	Gelenkschmerzen, Lymphadenopathie, unbehandelt	MW	Doxycycline/Hydroxychloroquine	40	-	+ ¹	nd	+	+	nd	+	+ ^{2,3}	+	nd	+
2	M	54	Lymphadenopathie, seronegative Polyarthritis, unbehandelt	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	38	-	+	nd	+	+	nd	-	nd	+	nd	+
3 [#]	M	62	Lymphadenopathie, unbehandelt	MW	Doxycycline/Hydroxychloroquine	37	-	+ ¹	Lymphknoten PAS ⁺	+	-	Lymphknoten ⁺	+	+	+	+	+
4	M	62	Seronegative Polyarthritis, unbehandelt	MW	Doxycycline/Hydroxychloroquine	30	-	+ ¹	nd	+	-	Synovialfluid ⁺	-	-	-	nd	-
5 [#]	W	74	Seronegative Polyarthritis, Durchfall, Gewichtsverlust, Entzündung der Orbita, CWD, unbehandelt	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	30	+	+	nd	+	nd	Glaskörperflüssigkeit ⁺	+	+	+	+	+
6	W	48	Seronegative Polyarthritis, Durchfall, Gewichtsverlust, CWD, unbehandelt	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	36	+	+	nd	nd	+	nd	+	+ ^{2,3}	+ ^{2,3}	nd	+
7	M	39	Seronegative Polyarthritis, Gewichtsverlust, unbehandelt	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	24	-	+ ¹	Lymphknoten PAS ⁺ , IHC ⁺	+	+	Lymphknoten ⁺	-	-	-	+	+
8	M	73	Seronegative Polyarthritis, unbehandelt	MW	Doxycycline/Hydroxychloroquine	24	-	+ ¹	nd	+	nd	nd	-	+	- ³	+	+
9	W	79	Seronegative Polyarthritis, unbehandelt	MW	Doxycycline/Hydroxychloroquine	20	-	+ ¹	nd	+	+	Synovialfluid ⁺ , Knochenmark ⁺	-	-	-	+ ²	+
10 [#]	M	69	Seronegative Polyarthritis, Durchfall, Gewichtsverlust, CWD, unbehandelt	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	20	+	+	nd	+	-	nd	nd	+	+	+	+
11	W	62	Seronegative Polyarthritis, unbehandelt	MW	Doxycycline/Hydroxychloroquine	18	-	+ ¹	Hautbiopsie PAS ⁺ , IHC ⁺	nd	-	nd	-	-	-	-	-
12	M	68	<i>T. whipplei</i> induzierte Endokarditis, behandelt für < 14 Tage	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	36	nd	nd	Herzklappe PAS ⁺ , IHC ⁺	nd	nd	Herzklappe +	-	-	+	nd	+
13 [#]	M	41	Gewichtsverlust, Durchfall, CWD, behandelt für < 14 Tage	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	33	+	nd	nd	+	+	nd	+	+	+	+	+
14	M	60	Seronegative Polyarthritis, behandelt für < 14 Tage	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	30	+ ¹	+ ¹	nd	nd	-	Synovialfluid ⁺	+	+	+	+	+
15	M	76	Seronegative Polyarthritis, unbehandelt	MW	Doxycycline/Hydroxychloroquine	17	-	+ ¹	nd	nd	-	Synovialfluid ⁺	-	- ³	-	-	-
16	W	55	Seronegative Polyarthritis, Gewichtsverlust, unbehandelt	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	20	-	+ ¹	Colon PAS ⁺	+	+	Colon ⁺	-	-	nd	nd	-
17 [#]	M	60	<i>T. whipplei</i> induzierte Endokarditis, behandelt für < 14 Tage	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	18	nd	nd	Colon IHC ⁺ , Herzklappe IHC ⁺	nd	nd	Colon ⁺ , Herzklappe ⁺	nd	+	nd	nd	+

3 Ergebnisse

Nr.	Geschlecht	Alter	klinische Symptome	Diagnose	Behandlung	Follow-Up (Monate)	Histologie			PCR							
							Duo PAS	Duo TW IHC	anderes Material	Duo	Liquor	anderes Material	EDTA Blut	PBMC	CD14 ⁺	CD14 ⁺	Zs.fassende Ergebnisse
18	W	36	Seronegative Polyarthritis, Durchfall, CWD, unbehandelt	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	13	+	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	+	
19	W	53	Seronegative Polyarthritis, unbehandelt	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	12	-	+	nd	+	-	nd	-	+	nd	nd	+
20	W	69	Seronegative Polyarthritis, Durchfall, CWD, unbehandelt	MW	Ceftriaxone und TMP/SFX	9	+	+	nd	nd	nd	nd	+	nd	nd	nd	+
Kontrollen (n=18)																	
1	M	52	Unterleibschmerz, präpylorisch polypoid-ulzeriertes Areal, unbehandelt	Gastritis	PPI	15	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-
2	M	34	anhaltende Unterleibschmerzen, Gewichtsverlust, unbehandelt	Gastritis, Pankreatitis	PPI	15	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-
3	W	59	Durchfall, Magenkrämpfe, unbehandelt	Reizdarmsyndom, Sojaallergie	Sojafreie Diät	15	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-
4	M	62	Unterleibschmerz, unbehandelt	Gastritis	PPI	15	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-
5	W	52	Oberbauchschmerzen, Refluxösophagitis, Durchfall, unbehandelt	Refluxösophagitis	PPI	15	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	-	-	-
6	M	49	Unterleibschmerz, unbehandelt	Refluxösophagitis	PPI	14	-	-	nd	-	-	nd	-	-	-	-	-
7	M	74	Unterleibschmerz, Durchfall, unbehandelt	alkoholinduzierte Pankreatitis	Alkoholfreie Diät, Analgetika, Pankreasenzyme	42	-	-	nd	-	nd	nd	-	nd	-	nd	-
8	W	57	Durchfall, Unterleib- und Gelenkschmerzen, unbehandelt	Reizdarmsyndrom, Sjögrens Syndrom	COX-2 und Peristaltik-Inhibitoren	32	-	-	nd	-	-	nd	-	-	-	nd	-
9	M	63	Lymphadenopathie, Fieber, unbehandelt.	Sarkoidose	Immunsuppression	30	-	-	nd	-	-	nd	-	-	-	-	-
10	W	60	Gelenkschmerzen, unbehandelt	Rheumatoide Arthritis	Immunsuppression	24	-	-	nd	nd	-	nd	-	-	-	nd	-
11	W	53	Refluxösophagitis, hypertensive Gastropathie, unbehandelt	Refluxösophagitis	PPI	30	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-	-	nd	-
12	W	25	Gewichtsverlust, Durchfall, Magenkrämpfe, unbehandelt	Zöliakie	Weizenfreie Diät	30	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-	-	nd	-
13	M	44	Allergischer Hautausschlag, Hashimoto-Thyreoiditis, unbehandelt	Gastritis	PPI	29	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-	-	nd	-
14	W	59	Durchfall, Gelenkschmerzen, Oberbauchschmerzen, unbehandelt	Duodenitis	PPI	25	-	-	nd	nd	nd	nd	-	-	nd	nd	-
15	M	46	Gelenkschmerzen, unbehandelt	Rheumatoide Arthritis	Immunsuppression	20	-	-	nd	-	-	nd	-	-	nd	nd	-
16	W	79	Oberbauchschmerzen, Durchfall, unbehandelt	Reizdarmsyndrom, ischämische Kolitis	Immunsuppression, Peristaltik-Inhibitoren	30	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-
17	M	53	Enteropathie, Durchfall, unbehandelt	HIV Enteropathie	Antiretrovirale Therapie	30	-	-	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	nd	-
18	W	58	Gewichtsverlust, Schluckbeschwerden, unbehandelt	Gastritis	PPI	15	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	-	nd	nd	-

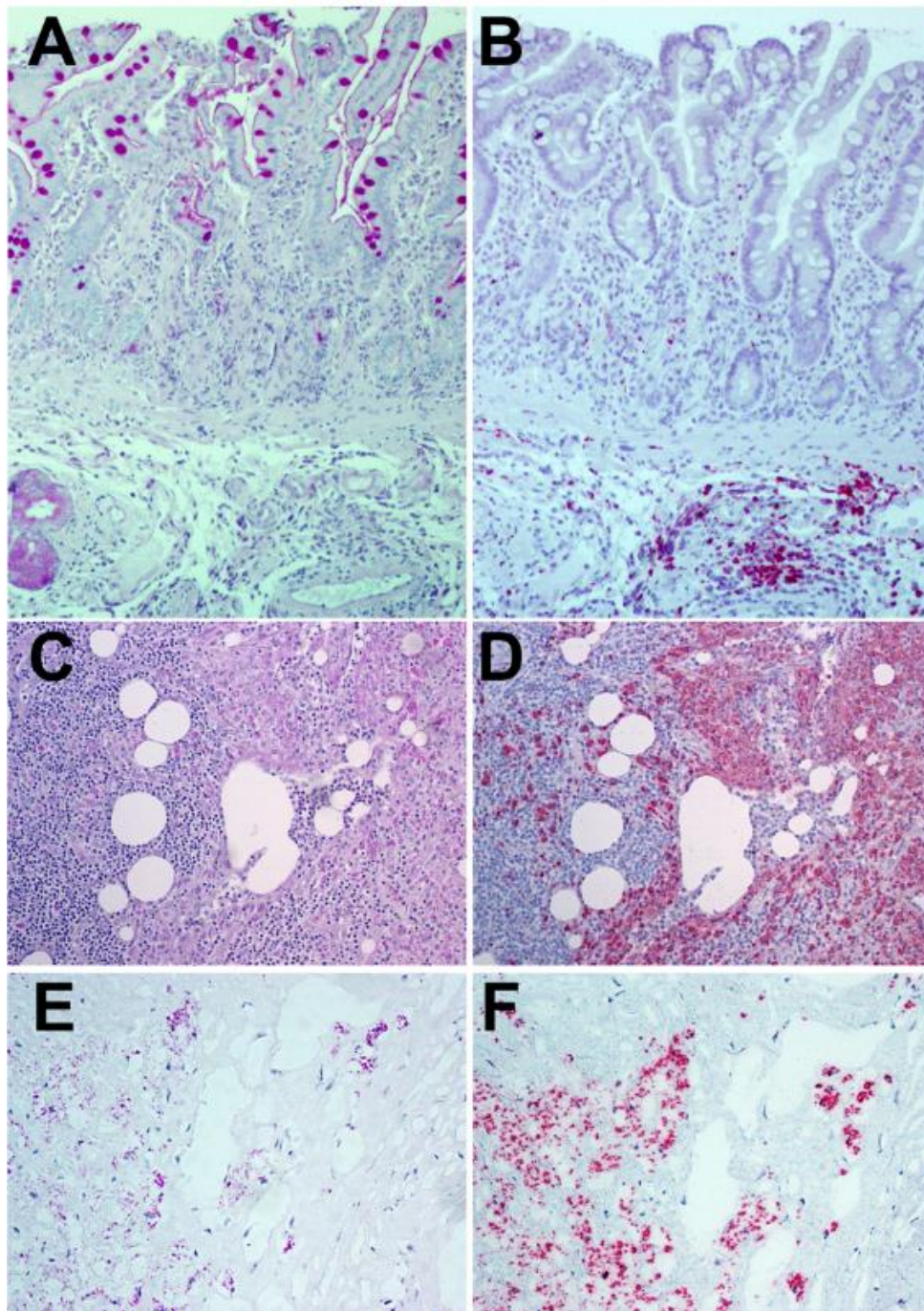


Abbildung 27: Nachweis eines atypischen MW anhand von Duodenalbiopsien, Lymphknoten und der Herzklappe.

Die Abbildungen vergleichen exemplarisch die lilafarbene PAS-Färbung (**A, C, E**) und die *T. whipplei* spezifische Immunhistochemie (IHC) in kräftigem Rot (**B, D, F**). Die konventionelle PAS-Färbung des Duodenums lieferte keinen MW-Befund (**A**). Anhand der *T. whipplei*-spezifischen IHC wurde eine Vielzahl infizierter Zellen in der Submukosa nachgewiesen (**B**). PAS⁺-Färbung in einem Lymphknoten mit Lymphangiektasie (**C**). Eindeutige *T. whipplei*-spezifische IHC des Lymphknotens (**D**). PAS⁺-Einschlüsse in einer Herzklappe (**E**). Die *T. whipplei*-spezifische IHC bewies die Infektion der Herzklappe mit *T. whipplei* (**F**). Vergrößerung aller Bilder 100x. Nachgedruckt mit Genehmigung von Molecular Diagnosis & Therapy [175].

4 Diskussion

4.1 Ausgangsfragestellung

Die Ausbildung eines chronischen MW ist trotz der ubiquitären Verbreitung von *T. whipplei* und dem gehäuftem Vorkommen selbst-limitierender Infektionen sehr selten [16, 31, 196]. Es stellte sich daher die Frage, weshalb die Exposition in einigen Patienten zur Entwicklung des schwerwiegenden MW führt, während der Großteil der Bevölkerung die Pathogene eliminieren und eine Infektion abwenden kann. Die Hypothese, dass die chronische *T. whipplei* Infektion auf einen besonders pathogenen Stamm zurückzuführen ist, wurde durch eine bakterielle Genotypisierung widerlegt [197]. Die Häufung von *T. whipplei* Infektionen in verschiedenen Familienanamnesen [45, 128, 198] stärkte die Hypothese, dass subtile Immundefekte für die Entwicklung des Krankheitsbildes prädisponieren [41]. In diesem Zusammenhang wurde eine Assoziation mit den HLA-Allelen DRB1*13 und DQB1*06 [42], einem IL-16 Polymorphismus [43], Th2-Reaktionen fördernden Polymorphismen in Zytokingenen [44] und die Relevanz von IRF4 [170] nachgewiesen. Die systemisch reduzierte Konzentration von IL-12p40 [33], die verringerte Th1-Aktivität [199] und die fehlende *T. whipplei*-spezifische Th1-Antwort in MW-Patienten [30] deuten auf Defekte in der adaptiven Immunabwehr hin. Hingegen spricht die alternative M ϕ 2 Aktivierung und die verminderte Fähigkeit *T. whipplei* effizient zu degradieren [35, 116, 117] für Limitationen des angeborenen Immunsystems, die eine Akkumulation und Ausbreitung der Pathogene begünstigen und somit essenziell zur Manifestation des Krankheitsbildes beitragen. Inwieweit sich die Defekte der angeborenen und adaptiven Immunabwehr gegenseitig bedingen und ob die mangelhafte Aktivierung der *T. whipplei* spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten [30] auf eine unzureichende Prozessierung der Erreger durch die APZ zurückzuführen ist, ist bisher nicht geklärt.

Um diesbezüglich weitere Erkenntnisse zu erlangen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine ineffiziente Präsentation von *T. whipplei* Antigenen seitens der M ϕ die fehlende CD4⁺ Reaktivität der MW-Patienten verschuldet oder ob diese auf einen T-Lymphozyten-Defekt oder eine T-Lymphozyten-Ermüdung zurückzuführen ist. Hierzu wurde die Induktion der spezifischen pro-inflammatorischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten-Antwort durch Hsp70 und dessen Co-Faktor GrpE analysiert sowie die T-Lymphozyten-Reaktion bei optimierter MHC-I Präsentation des *grpE* Antigens in einem allogenen *in vitro* System untersucht. Um zu prüfen, ob *T. whipplei* den vorherrschenden M ϕ 2 Phänotyp aktiv induziert, wurde der aus einer *T. whipplei* Infektion resultierende Phänotyp untersucht. Zudem wurden *T. whipplei* modulierte Gene anhand Mikroarray basierter Transkriptomanalysen analysiert. Basierend auf der Hypothese, dass die M ϕ von MW-Patienten aufgrund einer Prädisposition für *T. whipplei* Infektionen besonders suszeptibel sind, wurde in einer prospektiven Pilotstudie untersucht, ob sich die Pathogene in den monozytären Zellen des peripheren Blutes nachweisen lassen und inwieweit diese zur systemischen Verbreitung der Erreger beitragen.

4.2 Untersuchungen zur verminderten T-Lymphozyten-Reaktivität von MW-Patienten

Die chronische Infektion mit *T. whipplei* geht mit einer unzureichenden entzündlichen Reaktion gegen die Erreger einher, die sich nicht nur auf Monozyten und M ϕ beschränkt, sondern sich auch durch eine mangelnde Th1-Effektivität äußert [30]. Bisher war nicht bekannt, ob die mangelhafte Aktivierung von *T. whipplei*-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten bei MW-Patienten eine Folge unzureichender Antigenpräsentation aufgrund ineffizienter Prozessierung des Erregers oder eines T-Lymphozyten-Defekts ist. In dieser Arbeit wurde daher analysiert, ob das im Rahmen eines proteomischen Ansatzes identifizierte *T. whipplei* Antigen Hsp70 und sein Kofaktor GrpE [40] befähigt sind, pro-inflammatorische T-Lymphozyten-Antworten im peripheren Blut und in PBMC von MW-Patienten

auszulösen. Die antigene Funktion von Hsp70 ist gut analysiert [200] und bereits für *Leishmania infantum* [201] und *Helicobacter pylori* [202] bekannt.

Zur Untersuchung der Aktivierung peripherer CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten und gesunden Personen durch Hsp70 und GrpE wurden rekombinante, aufgereinigte Proteine verwendet. Die Analysen zeigten, dass sowohl Hsp70 (TW Hsp70) als auch GrpE von *T. whipplei* (TW GrpE) in gesunden, immunkompetenten Kontrollen eine Immunantwort auslösten. MW-Patienten hingegen waren nicht befähigt eine pro-inflammatorische CD4⁺ T-Lymphozyten-Reaktion auf die rekombinanten Proteine zu induzieren. Die verminderte Th1-Reaktivität der MW-Patienten war vom Behandlungszustand der Patienten unabhängig und blieb auch nach erfolgreicher Therapie des MW bestehen [191]. Somit wurde nachgewiesen, dass der Effekt der verminderten CD4⁺ Reaktion auf eine insgesamt unzureichende CD4⁺ T-Lymphozyten-Aktivierung, vermittelt durch eine immunologische Beeinträchtigung der APZ in MW-Patienten, zurückzuführen ist [30, 203, 204]. Konträr zu TW Hsp70 wies das Hsp70 von *E. coli* (EC Hsp70) sowie das GrpE von *M. tuberculosis* (MT GrpE) und *E. coli* (EC GrpE) ein geringes antigenes Potential auf. Dieses spiegelte sich in einer verminderten Anzahl aktivierter CD69⁺ IFN- γ ⁺ T-Lymphozyten wider und war darauf zurückzuführen, dass die Proteine der kommensalen *E. coli* Bakterien aufgrund eines ständigen Kontakts toleriert wurden [205] und die rekrutierten Probanden keine *M. tuberculosis* Infektion aufwiesen.

Trotta *et al.* zeigten ein erhöhtes zytolytisches Potential und eine stärkere *T. whipplei*-spezifische Degranulation im Vollblut unbehandelter MW-Patienten [191]. Basierend auf diesen Vorkenntnissen wurde die zytotoxische Aktivität der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten anhand von PBMC Stimulationen mit Hsp70 und den rekombinanten GrpE Proteinen analysiert. Hierbei wurde eine verminderte Anzahl *T. whipplei* spezifischer CD69⁺/IFN- γ ⁺ Zellen in MW-Patienten nachgewiesen. Diese Daten verdeutlichten, dass MW-Patienten weder auf CD4⁺ noch auf CD8⁺ T-Lymphozyten Ebene befähigt waren eine adäquate pro-inflammatorische Immunantwort gegen die rekombinanten Proteine auszulösen. Um die Ursache der verminderten T-Lymphozyten-Antwort weitergehend zu untersuchen, wurde die T-Lymphozyten-Aktivierung nach optimierter MHC-I Präsentation der *grpE* Antigene analysiert. Der Austausch eines Aminosäurerests in der LCR3-Sequenz im Zuge der GrpE Plasmid-Konstruktionen ermöglichte die Peptid-Präsentation über den HLA-ABC-Komplex. Optimiert wurde die Präsentation durch die Koftransfektion mit CD86, einem kostimulatorischen Signal, das die T-Lymphozyten-Aktivierung stärkt [65]. Der Transfer der Plasmide in das Zytoplasma der PBMC wurde durch kurze Stromimpulse erreicht, welche die Integrität der Zellmembran physikalisch störten und eine Porenbildung induzierten (Elektroporation) [206]. Die zytoplasmatischen Peptide wurden über MHC-I präsentiert und die Expression der Marker Perforin, Granzym und Granulysin genutzt, um die CD8⁺ CTL Aktivität gegen die *grpE* Antigene zu analysieren. CD8⁺ CTL üben ihre Effektorfunktion über die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ sowie über die zytolytische Wirkung von Perforin und Granzym aus [207-210]. Perforin vermittelt dabei die Ausbildung von Poren in den Zellmembranen der Zielzellen, über welche Granulysine und Granzyme eindringen und die Aktivierung einer apoptotischen Signalkaskade ermöglichen [211-213]. Die Analyse der Transfektionsexperimente zeigte einen signifikant erhöhten Anteil von Perforin⁺ CD8⁺ CTL in MW-Patienten. Zudem war ein tendenzieller Anstieg der Granulysin⁺, Granzym B⁺ und IFN- γ ⁺ CD8⁺ CTL gegenüber gesunden Kontrollen nachweisbar. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass MW-Patienten bei adäquater Antigenpräsentation befähigt waren eine *T. whipplei*-spezifische CD8⁺ Antwort auszulösen. Die verminderte CD8⁺ T-Lymphozyten Aktivität der MW-Patienten ist somit nicht durch einen T-Lymphozyten-Defekt, sondern vielmehr durch eine ineffektive Prozessierung und Präsentation der Antigene durch APZ bedingt. Durch ihre zytolytische Aktivität können die CD8⁺ CTL die verminderte CD4⁺ Reaktivität zumindest teilweise

ausgleichen. Diese kompensatorische Kapazität, die im peripheren Blut nachgewiesen wurde, kommt in der am stärksten von der *T. whipplei* Infektion betroffenen Darmschleimhaut jedoch nicht ausgeprägt genug an, da weder die Anzahl der intraepithelialen Lymphozyten [35], noch die Perforin-Expression in der duodenalen Mukosa [214] von MW-Patienten erhöht ist.

Im Zuge der durchgeführten Analysen wurde zudem ein erhöhter Anteil Perforin⁺ CD4⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen. Dieser ist vermutlich durch Übernahme des Proteins, beispielsweise über lysierte PBMC, und dessen Präsentation über MHC-II zu erklären. Die Tatsache, dass der Anteil CD4⁺ CTL in MW-Patienten erhöht war, spricht dafür, dass CD4⁺ CTL aufgrund der inadäquaten Th1-Reaktivität eine bedeutendere Rolle einnehmen als in gesunden Kontrollen. CD4⁺ CTL werden vornehmlich mit chronischen Virusinfektionen wie dem humanen Cytomegalievirus [215], HIV [216] und Hepatitis Viren [217] in Verbindung gebracht, wurden jedoch auch in chronischen Entzündungsreaktionen und Autoimmunkrankheiten beschrieben [71, 218]. Chronische Virusinfektionen führen zu einer Zunahme CD4⁺ Perforin⁺ T-Lymphozyten, wodurch auf ihre Rolle bei der Immunantwort geschlossen wird [219]. Aufgrund der Sekretion zytolytischer Moleküle wie Perforin sind CD4⁺ CTL entsprechend ihrer CD8⁺ CTL Äquivalente befähigt, direkte Effektorfunktionen auszuführen und zu einer Abtötung der Zielzellen beizutragen [220-222]. Inwieweit die vermehrte Perforin-Expression der CD4⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten auf eine *T. whipplei* spezifische Immunantwort zurückzuführen ist und ob es sich bei dieser Zellpopulation tatsächlich um CD4⁺ CTL handelt, sollte in weiterführenden Untersuchungen geprüft werden. Zudem sollten die Ergebnisse durch weitere Transfektionsexperimente validiert und die Ausbildung einer adäquaten T-Lymphozyten-Antwort bei optimierter Antigenpräsentation bestätigt werden. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Verbesserung der Funktionalität der CD8⁺ T-Lymphozyten bei optimaler HLA-ABC Antigenpräsentation belegt. Um ausführliche Rückschlüsse auf die CD4⁺ Reaktivität zu ziehen, sind Transfektionen mit GrpE-Plasmiden zur optimierten MHC-II Präsentation notwendig. Diese Analysen sollten neben den intraindividuellen Transfektionseffizienzen von pGrpE und p86 die Basisaktivierung der T-Lymphozyten berücksichtigen. Der Aktivierungszustand der T-Lymphozyten vor erfolgter Transfektion wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. Die Daten der Granzym B- und Perforin-Bestimmung im Vollblut wiesen jedoch darauf hin, dass die Basalaktivität der T-Lymphozyten in MW-Patienten per se erhöht ist [191]. Für MW-Patienten wurde eine Verschiebung der CD4⁺/CD8⁺ Ratio zugunsten der CD8⁺ T-Lymphozyten beschrieben [36, 223]. Diese Verschiebung ist jedoch nur bei MW-Patienten vor Therapiebeginn zu beobachten und gleicht sich unter bestehender Therapie an die Verhältnisse gesunder Kontrollen an [224]. In den hier dargelegten Experimenten wurden ausschließlich PBMC behandelter MW-Patienten transfiziert, sodass eine Verschiebung der CD4⁺/CD8⁺ Ratio nicht zu erwarten war und keinen Einfluss auf die Analyse der zytotoxischen Reaktivität haben sollte. Um jeweilige Divergenzen zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen aussagekräftig darzustellen, sollten die initialen Verhältnisse der autologen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in weiterführenden Analysen jedoch überprüft werden.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass MW-Patienten nicht befähigt waren, gegen die antigenen Proteine GrpE und Hsp70 von *T. whipplei* eine spezifische T-Lymphozyten-Reaktivität auszubilden. Hingegen wurde in gesunden Kontrollen eine starke Immunreaktion gegen die Stimuli detektiert. Bei optimierter MHC-I Präsentation der Antigene war eine vermehrte Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten in MW-Patienten zu beobachten. Die verstärkte Aktivierung lässt den Rückschluss zu, dass die mangelnde T-Lymphozyten-Aktivierung in MW-Patienten nicht auf einen T-Lymphozyten-Defekt, sondern vielmehr auf eine inadäquate Prozessierung oder eine unzureichende Präsentation der Erreger seitens der APZ zurückzuführen ist. Die verstärkte Perforin- und Granzym B-Expression in den CD8⁺ T-Lymphozyten des peripheren Blutes wies zudem drauf hin, dass CD8⁺ CTL stärker an der Abwehr

von *T. whipplei* beteiligt sein könnten, als bisher angenommen wird. Möglicherweise übernehmen die CD8⁺ CTL eine Art Bypass-Funktion, um die ineffiziente Antigenpräsentation über den MHC-II Komplex und die verminderte Aktivierung der CD4⁺ T-Lymphozyten zu kompensieren.

4.3 Analyse der Immunmodulation durch *T. whipplei*

4.3.1 Charakterisierung *in vitro* differenzierter Mφ und Analyse des Phänotyps

Humanpathogene intrazelluläre Bakterien sind in der Lage, der Immunabwehr mithilfe verschiedener Immun-Escape-Mechanismen zu entgehen [53, 225, 226]. Auch *T. whipplei* sichert sein intrazelluläres Überleben durch die Modulation der Mφ-Funktion [38, 116]. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob *T. whipplei* aktiv befähigt ist, den alternativ aktivierten Mφ2 Phänotyp zu induzieren und welche Gene die Etablierung einer produktiven Infektion ermöglichen.

Die Polarisation der Mφ ist essenziell vom Mikromilieu des Gewebes abhängig, in das die Monozyten migrieren und in dem sie proliferieren [96, 98]. Hierbei begünstigen die lokal vorherrschenden Chemokine, Zytokine und Zell-Zell-Interaktionen die Polarisation in klassisch aktivierte Mφ1 oder alternativ aktivierte Mφ2. Mφ1 fördern die Entzündungsreaktion durch die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen [81, 82, 103], während Mφ2 eine immunologische Toleranz vermitteln [92]. Da eine Polarisierung der Mφ in den Mφ2 Phänotyp bereits für andere Infektionskrankheiten und Bakterien der Mikrobiota beschrieben wurde [227-231], wurde in dieser Arbeit analysiert, ob auch *T. whipplei* befähigt ist, die Effektorfunktionen der Mφ aktiv zu modulieren. Die hierzu *in vitro* differenzierten Mφ2 zeigten eine gestreckte, spindelförmige Morphologie und ließen sich morphologisch eindeutig von den rundlichen Zellen mit spiegeleiförmiger Morphologie des Mφ1 Phänotyps unterscheiden [103, 232].

Mφ2 waren sowohl in gesunden Kontrollen als auch in MW-Patienten durch eine vermehrte Expression der Oberflächenmarker CD14, CD163 und HLA-DR charakterisiert [82, 103, 104, 115]. Die Mφ2 Marker CD68 und CCL-18 zeigten sich bei gesunden Kontrollen signifikant induziert. Die vermehrte Expression von CD14, CD163 und CD68, aber auch HLA-DR und CCL-18 in Mφ2 wurde durch die Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray-Technologie bestätigt. Im Zusammenspiel mit einer vermehrten IL-10 Konzentration in den Zellkulturüberständen wurde untermauert, dass die durch M-CSF Stimulation generierte Zellpopulation dem alternativ aktivierten Mφ2 Phänotyp entsprach [103]. Mφ2 sind durch eine vermehrte Expression des *Scavenger*-Rezeptors CD163 charakterisiert [104, 112, 113]. Die Tatsache, dass die CD163 Expression innerhalb der Mφ1 von MW-Patienten erhöht vorlag und dass für *T. whipplei* infizierte Mφ2 (M2pTW) eine Reduktion der CD163 Expression zu verzeichnen war, spricht dafür, dass die Mφ2-Aktivierung unabhängig von einer *T. whipplei* Infektion ein Charakteristikum von MW-Patienten ist. Diese Erkenntnis deckt sich mit Beobachtungen von Moos *et al.*, die bereits für die peripheren Monozyten von MW-Patienten eine Mφ2-Aktivierung zeigten [35]. Der analysierte Datensatz von Moos *et al.* wies einen signifikanten Anstieg der CD163 Expression nach Stimulation von CD14⁺ Monozyten mit *T. whipplei* Lysat auf, welcher im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Diese Divergenz ist wahrscheinlich durch den unterschiedlichen Analysezeitpunkt zu begründen. Während Moos *et al.* die CD163 Expression 6 Stunden nach Stimulation mit *T. whipplei* Lysat bestimmten, erfolgte die Analyse in den hier dargelegten Experimenten nach 14 und 21 Tagen, um die Zustände des chronischen Krankheitsbildes nachzustellen.

Nach *in vitro* Infektion mit vitalen *T. whipplei* Bakterien wurde eine Reduktion der CD68, HLA-DR und CCL-18 Expression nachgewiesen. Dieser Effekt wurde nicht durch fragmentierte Bestandteile (*T. whipplei* Lysat) oder sekretierte Faktoren (*T. whipplei* Überstand) hervorgerufen, wodurch auf eine

aktive immunmodulatorische Aktivität von *T. whipplei* geschlossen werden kann. Es wurde eine Induktion von CD68 durch inflammatorische Stimuli beschrieben [233], jedoch sind die Funktionen von CD68 bisher nicht hinreichend charakterisiert. Die Reduktion von HLA-DR ist im Zuge einer chronischen *T. whipplei* Infektion von besonderer Bedeutung. Im Allgemeinen geht eine verminderte HLA-DR Expression mit einer reduzierten Antigenpräsentation und einer inadäquaten T-Lymphozyten-Aktivierung einher. Sie vermittelt indirekt die Reduktion der IFN- γ Produktion [234] und fördert die systemische Ausbreitung der Erreger, welche sich in einer erhöhten Sterblichkeitsrate von septischen Patienten und Patienten mit bakteriellen Infektionen widerspiegelt [235-238].

Die Hypothese, dass *T. whipplei* die HLA-DR Expression in suszeptiblen Patienten aktiv moduliert, ist mit zuvor veröffentlichten Daten kompatibel. Geelhaar-Karsch zeigte in ihrer Dissertation eine verminderte HLA-DR Expression im Vollblut von MW-Patienten, sodass der Effekt nicht nur lokal auf den Infektionsort begrenzt, sondern auch in der Peripherie vorherrschend ist [239]. Damit kann die Reduktion von HLA-DR in Kombination mit der erhöhten IL-10 Produktion zur verminderten Th1-Antwort in MW-Patienten beitragen [240-242]. Ben Azzouz *et al.* zeigten zudem, dass *T. whipplei* neben HLA-DR auch mit HLA-G Genen interagiert. HLA-G wurde von Monozyten nach *T. whipplei* Infektion vermehrt exprimiert und stand mit einer reduzierten TNF- α Sekretion in Verbindung [243]. Die verminderte TNF- α Sekretion bekräftigt die Annahme immunmodulatorischer Immunevasionsmechanismen. Gestützt wird diese Annahme durch die Reduktion der CCL-18 Expression sowie des Anstiegs der CD16 Expression bei Präsenz intrazellulärer *T. whipplei*. CCL-18 wird von Monozyten und M ϕ konstitutiv gering exprimiert [244], kann jedoch durch LPS oder mikrobielle Komponenten induziert werden [245, 246]. Funktionell wirkt CCL-18 chemotaktisch auf B- [246] und T-Lymphozyten [247], Monozyten sowie DCs [248]. Eine *T. whipplei* induzierte Repression von CCL-18 kann somit die Immunantwort durch eine verminderte Rekrutierung von Immunzellen unterdrücken [246-249] – ein Mechanismus, der die Proliferation und Verbreitung der Erreger zusätzlich begünstigt. Zeitgleich fördert ein Anstieg der CD16 Expression die Persistenz von *T. whipplei* und somit die Manifestation des MW [119]. Da CD16 durch IL-10 induziert wird [101, 250, 251], könnte der Anstieg von CD16 auch auf einen Sekundäreffekt, vermittelt durch die vermehrte Expression von IL-10 sowohl in *in vitro* infizierten Monozyten und M ϕ [117] als auch in der duodenalen Mukosa unbehandelter MW-Patienten, zurückzuführen sein [35, 116].

Im Rahmen der Arbeit wurde IL-10 mit Detektionsleveln von 5 mg/ml lediglich marginal in den Überständen *in vitro* differenzierter M ϕ nachgewiesen, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten bestand. Die geringe IL-10 Konzentration in den analysierten Überständen ist vermutlich auf die suboptimale Langzeitlagerung der Überstände bei -20°C zurückzuführen. Die weitergehende Analyse der Zellkulturüberstände wies eine vermehrte Sekretion von IL-6 und TNF- α für M1pTW und M1pBCG auf. Diese Beobachtung deckte sich mit Daten von Geelhaar-Karsch, die im Serum unbehandelter MW-Patienten eine erhöhte IL-6 Konzentration nachwies [239]. Eine Überexpression von IL-6 führt zu diversen Krankheiten, unter anderem zu rheumatoider Arthritis [252]. Die in MW-Patienten beschriebenen Gelenksbeschwerden sind somit möglicherweise auf die vermehrte IL-6 Sekretion zurückzuführen. Neben seiner Funktion in der Regulation der Immunantworten und der Differenzierung zytotoxischer CD8⁺ T-Lymphozyten induziert IL-6 die Differenzierung von Monozyten in M ϕ [253] und fördert durch Inhibierung von Thioredoxin die Persistenz von *T. whipplei* [119].

Zusammenfassend lieferten die phänotypischen Analysen keinen Hinweis darauf, dass *T. whipplei* den vorherrschenden M ϕ 2 Phänotyp der MW-Patienten induziert. Stattdessen scheint die alternative M ϕ -Aktivierung ein Charakteristikum von MW-Patienten zu sein, das die Manifestation der Infektion

begünstigt. Zudem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass *T. whipplei* aktiv mit den Mφ interagiert, um seine intrazelluläre Persistenz und systemische Verbreitung zu gewährleisten.

4.3.2 Etablierung produktiver und protektiver Infektionsbedingungen

Der aktuelle Stand der Wissenschaft [41] und die vorhergehenden Daten der phänotypischen Analyse weisen darauf hin, dass die Manifestation des MW mit prädisponierenden Faktoren assoziiert ist. Diese Faktoren sind zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nur unzureichend bekannt. Um diesbezüglich weitere Erkenntnisse zu erlangen, wurden Kulturbedingungen untersucht, die eine produktive Mφ Infektion mit bzw. eine Protektion vor einer *T. whipplei* Infektion ermöglichen.

Es wurden die protektiven Kapazitäten von Thioredoxin, anti-IL-16, INF-γ, IL-1β und TNF-α auf die Replikation von *T. whipplei* in Mφ1 mittels *T. whipplei* spezifischer *rpoB* RT-PCR untersucht [168]. Als Testansatz für eine produktive Infektion wurde die Inkubation von Mφ2 mit IL-10 und IL-16 gewählt. Die Auswahl der analysierten Zytokine erfolgte auf Basis bereits beschriebener Literatur [119, 124, 243, 254, 255]. Die durchgeführten Analysen wiesen eine geringfügig gesteigerte Phagozytosekapazität der Mφ2 nach [240, 256]. Zudem offerierte die *rpoB* RT-PCR innerhalb der Mφ1 vergleichbare CT-Werte für die Zytokine Thioredoxin, anti-IL16, IFN-γ und IL-1β. Von dem pro-inflammatorischen Zytokin TNF-α wurde vermutet, dass es die Phagozytose und Eliminierung von *T. whipplei* steigert [255]. Diese Annahme wurde durch den geringfügig erhöhten CT-Wert TNF-α prä-inkubierter Mφ1 widerlegt. In TNF-α stimulierten Mφ1 wurde eine Proliferation der *T. whipplei* Bakterien detektiert, während die Pathogene in allen weiteren Ansätzen degradiert wurden. Die Replikation unter TNF-α kann, zusammen mit dem detektierten Anstieg der TNF-α Sekretion in M1pTW, dafürsprechen, dass das Zytokin im Rahmen einer pro-inflammatorischen Abwehrreaktion vermehrt sekretiert wird, die *T. whipplei* Replikation jedoch nicht effizient eindämmt. Die effektivste *T. whipplei* Elimination wurde in Mφ2 mit Zusatz von IL-10 nachgewiesen. Der verminderte CT_{T0}-Wert für IL-10 prä-inkubierten Mφ2 bestätigte die Hypothese, dass das von Mφ2 sekretierte IL-10 für die gesteigerte Phagozytose verantwortlich ist [257]. Vorhergehende Arbeiten zeigten, dass IL-10 die mikrobizide Aktivität der Mφ vermindert [79, 258]. Dieses Ergebnis wurde, ebenso wie die Bedeutung von IL-16 für die intrazelluläre Persistenz von *T. whipplei* [38, 119], im Zuge dieser Arbeit nicht bestätigt.

In den durchgeführten Analysen lag der Grenzwert (*Cut-off*) der *rpoB* RT-PCR bei 4×10^5 Bakterien. Bei einer geringeren Bakterienzahl war der ermittelte CT-Wert nicht von der *T. whipplei* Konzentration abhängig, sodass CT-Werte in den Grenzbereichen kritisch bewertet werden sollten. Die dargestellten Ergebnisse der *rpoB* RT-PCR zum Nachweis vitaler Bakterien sollten in weiterführenden Experimenten verifiziert werden, welche auch die Quantifizierung eines Housekeeping Gens einbeziehen. Trotz bekannter Limitationen wurde, basierend auf den Daten dieser Arbeit, die Kultivierung der Mφ1 mit 10 ng TNF-α als produktiver Ansatz und die Kultivierung der Mφ2 mit 10 ng IL-10 als protektiver Ansatz einer *T. whipplei* Infektion gewählt. Untersuchungen an axenischen *T. whipplei* Kulturen bestätigten, dass die beobachteten Effekte der *T. whipplei* Proliferation unter TNF-α und Degradation unter IL-10 auf intrazellulär wirkende Mechanismen zurückzuführen waren.

4.3.3 Analyse der differentiellen Genexpression

Zur Identifikation von Genen, die in MW-Patienten eine chronische Infektion mit *T. whipplei* steuern, wurden Transkriptomanalysen der Mφ von MW-Patienten und gesunden Kontrollen durchgeführt. Die globale Änderung des Transkriptoms im Zuge der *in vitro* Polarisierung von Mφ durch M-CSF und GM-CSF wurde als bekannt vorausgesetzt [104, 259], sodass die Unterschiede zwischen Mφ1 und Mφ2 in dieser Arbeit nicht analysiert wurden. Der Fokus der Analysen richtete sich auf jene Gene, die zwischen

MW-Patienten und gesunden Kontrollen differenziell exprimiert wurden oder im Zuge einer *T. whipplei* Infektion verändert vorlagen.

Die Transkriptomanalysen von MW-Patienten und gesunden Kontrollen verdeutlichten – ungeachtet des Mφ-Subtyps und dem Vorliegen einer *T. whipplei* Infektion – die differenzielle Expression von 105 Genen. Diese 105 Gene stellen Kandidatengene für die Manifestation des MW dar. Die differenzielle Expression von IRF5 erschien im Zuge der Analysen besonders eindrucklich. IRF galten ursprünglich als Regulatoren der Typ I IFN Expression. Inzwischen wurde auch ihre Bedeutung für den IgG Switch in B-Lymphozyten, die Mφ Polarisation und die Ontogenese von DCs sowie die Beteiligung an der Apoptoseregulation nachgewiesen [86, 260-264]. Krausgruber *et al.* zeigten, dass IRF5 die Mφ1 Polarisation induziert [108]. Zudem resultieren bakterielle Infektionen oder GM-CSF Stimulationen von Monozyten in einer vermehrten IRF5 Expression [108, 265], die die klassischen Mφ1 Marker IL-12, IL-23 und TNF-α induziert und das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 reprimiert [108, 266, 267]. Neben der Aktivität von IRF5 in der antiviralen Immunantwort und der Typ I IFN Produktion [268] wurde eine IRF5-Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose [263, 269] sowie bei mikrobiellen Infektionen [270, 271] und Entzündungen nachgewiesen [108, 272]. Die Induktion von IRF5 in MW-Patienten ist folglich nicht nur für die Mφ Polarisation, sondern auch für das Wechselspiel von angeborener und adaptiver Immunantwort von Bedeutung und somit für das Krankheitsbild des MW relevant [262]. IRF5 transloziert nach direkter Interaktion mit *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) und dem TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 6 (*tumor necrosis factor receptor associated factor 6*; TRAF6) in den Zellkern, wo es an den Promotor pro-inflammatorischer Gene, wie *IL12b*, bindet [266]. Durch diese Funktionalität verstärkt IRF5 indirekt die Differenzierung von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten zu Th1-Zellen, die ihrerseits potente Entzündungsmediatoren produzieren [108]. Die Induktion von Entzündungsmediatoren durch IRF5 trägt zur Pathogenese von entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis [273, 274], Multipler Sklerose [275], systemischem Lupus erythematoses [276-278] und entzündlichen Darmerkrankungen (*Inflammatory Bowel Disease*; IBD) [279] bei. Es ist daher naheliegend, dass IRF5 – gegebenenfalls im Zusammenspiel mit IL-10 – die Entstehung von Gelenksbeschwerden in MW-Patienten bedingt. Die Beteiligung von IRF an der Pathogenese des MW rückte bereits durch Forschungsergebnisse von Guérin *et al.* in den Fokus. Diese zeigten eine wiederkehrende R98W *loss-of-function* Mutation im *irf4* Gen in vier MW-Patienten, die an der Entstehung des MW beteiligt zu sein scheint [170]. Besondere Relevanz hat diese *loss of function* Mutation vor dem Hintergrund, dass IRF5 kompetitiv durch IRF4 inhibiert wird [280, 281]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine Unterschiede in der IRF4 Transkription zwischen gesunden Kontrollen und MW-Patienten nachgewiesen. Die vermehrte Expression von IRF5 spricht im Zusammenspiel mit den Ergebnissen von Guérin *et al.* jedoch dafür, dass eine Dysregulation der IRF für die Entwicklung der Mφ und somit für die Etablierung des MW eine bedeutende Rolle spielt.

Neben IRF steuern weitere Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs), *signal transducers and activators of transcription* (STATs) und *GATA binding protein* (GATA) 3, die dynamische Adaptation der Mφ an die vorherrschende Mikroumgebung [282]. Einer dieser Faktoren, STAT6, zeigte sich in der Transkriptomanalyse sowohl in Mφ1 als auch Mφ2 von MW-Patienten vermehrt exprimiert. Im Gegensatz zu IRF5 ist STAT6 der Schlüsseltranskriptionsfaktor bei der IL-4 oder IL-13 vermittelten Mφ2 Polarisation [97, 283]. Eine Induktion von STAT6 spiegelt den Mφ2 Phänotyp in MW-Patienten wider, steht aber mit der Mφ1 Aktivierung durch IRF5 im Widerspruch. Die Induktion beider gegensätzlich wirkenden Faktoren der Mφ Polarisation, IRF5 und STAT6, bestätigt die vielfach vertretene Theorie, dass Mφ *in vivo* ein

plastisches Kontinuum darstellen, in dem das vorliegende intrazelluläre Milieu aus Zytokinen, Chemokinen und weiteren Mediatoren die Entstehung des Phänotyps prägt [96].

Aufgrund der Vielzahl der differenziell exprimierten Gene zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen ist eine vollumfängliche Erörterung der Einzelgene an dieser Stelle nicht möglich. Die Induktion der HLA-DRB1 Expression in M ϕ 2 (Vergleich 2) und M1pTW (Vergleich 3) von MW-Patienten sei jedoch als weiteres interessantes Ergebnis der Transkriptomanalyse hervorgehoben. Die gewonnenen Daten bekräftigten die Forschungsergebnisse von Martinetti *et al.*, welche zuvor eine Assoziation des chronischen MW mit dem HLA-DRB1*13 nachweisen konnten [42]. Möglicherweise werden *T. whipplei* Antigene von Trägern des HLA-DRB1*13 Allels ineffizient präsentiert, woraus die verminderte Th1-Lymphozyten-Reaktivität resultiert [30]. Da jedoch nur eine Minderheit der Träger des Haplotyps HLA-DRB1*13 für eine *T. whipplei* Infektion anfällig ist, kann dies nicht der einzige Grund für die Manifestation des MW sein. Vielmehr müssen zusätzliche – prädisponierende – Faktoren an der Pathogenese beteiligt sein.

Vergleichend zu den basalen Expressionsunterschieden zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen fiel die *T. whipplei* induzierte Änderung der Genexpression gering aus. Es wurde kein Gen identifiziert, dass sowohl in M ϕ 1 als auch M ϕ 2 von MW-Patienten und gesunden Kontrollen *T. whipplei* induzierten Modulationen unterlag. Dieses Ergebnis legt nahe, dass *T. whipplei* nicht global in die Genexpression einwirkt. Vielmehr scheinen die prädisponierenden Faktoren eine Infektion suszeptibler Individuen zu begünstigen. Nach der produktiven Infektion erfolgt eine *T. whipplei* induzierte Immunmodulation, die die Immunantwort supprimiert und die Verbreitung der Pathogene gewährleistet. Bestätigt wird diese Hypothese durch die phänotypischen Analysen dieser Arbeit, in denen eine *T. whipplei* induzierte Immunmodulation sowohl in MW-Patienten als auch in gesunden Kontrollen nachgewiesen wurde. Grundsätzlich ist anzumerken, dass die Aussagekraft der Transkriptomanalyse durch die geringe Fallzahl von je zwei MW-Patienten und zwei gesunden Kontrollen limitiert ist. Zudem wurde das M ϕ Transkriptom unter der Zugabe von IL-10 und TNF- α analysiert, um die zuvor definierten produktiven und protektiven Bedingungen einer Infektion widerzuspiegeln. Es wäre denkbar, dass die identifizierten Kandidatengene nicht per se zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen divers moduliert, sondern auf eine unterschiedliche Reaktion gegen die beiden Stimuli zurückzuführen sind. Um diesbezüglich weitere Informationen zu erhalten, ist ein Vergleich mit nicht-stimulierten *in vitro* differenzierten M ϕ unabdingbar. Ein Vergleich mit zuvor veröffentlichten Arbeiten könnte erste Hinweise liefern, wird jedoch durch einen Mangel einheitlicher Protokolle zur *in vitro* Polarisation von M ϕ erschwert [99, 102]. In weiterführenden Experimenten sollten die identifizierten Kandidatengene, insbesondere IRF5, STAT6 und HLA-DR, in *in vitro* polarisierten M ϕ und CD14⁺ Monozyten mittels RT-qPCR validiert und quantifiziert werden. Western Blots der Proteine und die *in situ* Dokumentation differenziell exprimierter Gene könnten dazu beitragen, die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zu untermauern, da die mRNA Konzentrationen nicht zwangsläufig mit der Menge an exprimiertem Protein korreliert.

4.4 Prospektive Pilotstudie zur Analyse der systemischen *T. whipplei* Verbreitung

Die molekularen Mechanismen der systemischen *T. whipplei* Verbreitung sind nur unzureichend geklärt. Die vorhandenen Daten sprechen für einen Erstkontakt mit den Erregern im frühen Kindesalter [31, 284], der in den meisten Fällen in einer protektiven zellulären und humoralen Immunabwehr resultiert [30, 39]. In wenigen Individuen kommt es nach fäkal-oraler Übertragung [20, 23] zur Passage der Pathogene in die Lamina propria, wo *T. whipplei* durch M ϕ und unreife DC aufgenommen wird [49]. *T. whipplei* akkumuliert in den M ϕ des oberen Dünndarms, worauf die PAS⁺ Färbung in MW-

Patienten basiert [158]. Die infizierten Mφ sind resident, sodass weitere Zellpopulationen an der systemischen Verbreitung der Pathogene beteiligt sein müssen. Das Auftreten isolierter Infektionen ohne gastrointestinale Beteiligung, beispielsweise der Gelenke [129, 141], des ZNS [129, 136] oder die *T. whipplei* induzierte Endokarditis [143, 144], spricht für eine systemische Verbreitung über das Blutsystem. Die Ergebnisse der phänotypischen Analyse und der Transkriptomanalyse dieser Arbeit wiesen darauf hin, dass die Mφ und Monozyten von MW-Patienten für eine *T. whipplei* Infektion besonders suszeptibel sind. Gestützt wird diese Hypothese durch Ergebnisse von Raoult *et al.*, die die Erreger in zirkulierenden Monozyten immunhistochemisch nachweisen konnten [195].

In einer prospektiven Pilotstudie wurden EDTA Vollblut, aufgereinigte PBMC sowie die CD14⁺ und CD14⁺ depletierte Monozytenpopulationen von MW-Patienten und gesunden Kontrollen mittels *rpoB* RT-PCR auf die Präsenz bakterieller DNA analysiert [168]. Hierbei wurde *T. whipplei* mit einer Sensitivität von bis zu 80 % (16 von 20 Patienten) im Blut nachgewiesen. Der molekulare Nachweis aus PBMC war der Analyse aus EDTA Vollblut aufgrund eines höheren Anteils bestätigter MW-Patienten und niedrigeren CT-Werten überlegen. Die weitergehende Aufreinigung von CD14⁺ Monozyten resultierte in keinem verbesserten Nachweis der Erreger. CD14^{high} Monozyten sind *in vitro* befähigt, *T. whipplei* effizient zu eliminieren [119]. Es ist daher naheliegend, dass die *T. whipplei* DNA in der CD14⁺ angereicherten PBMC Fraktion effizienter degradiert wird. Zudem exprimieren CD14^{low} Monozyten vermehrt CD16, welches mit der Persistenz von *T. whipplei* einhergeht [119]. Die vorhergehenden phänotypischen Analysen verdeutlichten zudem, dass eine persistente *T. whipplei* Infektion eine Reduktion von CD14 bei zeitgleichem Anstieg von CD16 induzierte. Die geringe Reinheit der CD14^{high} Monozyten in MW-Patienten kann somit durch die CD14 Reduktion im Zuge der *T. whipplei* Infektion erklärt werden. Wurden CD14^{low} Monozyten in die Reinheitsbestimmung einbezogen, ergaben sich vergleichbare Werte zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen. Der Nachweis bakterieller DNA in der CD14⁺ depletierten Zellfraktion ist möglicherweise durch eine geringe Affinität der anti-CD14 Antikörper gegen die CD14^{low} Monozyten zu begründen. Eine schwache Bindung könnte in einer Kontamination der CD14⁺ depletierten Monozytenfraktion mit CD14^{low} Monozyten resultieren. Näherliegend ist jedoch die Schlussfolgerung, dass *T. whipplei* nicht nur mit Monozyten, sondern auch mit anderen Zellen des peripheren Blutes assoziiert ist. So kommen neben den CD16⁺CD14^{low} Monozyten Lymphozyten [18] oder basophile Granulozyten als Wirtszellen für *T. whipplei* in Betracht.

Der erfolgreiche Erregernachweis aus dem Blut hat mit Hinblick auf die Diagnostik des MW eine besondere Relevanz. Die PAS⁺ Färbung duodenaler Biopsien stellt den Goldstandard der MW Diagnostik dar [156, 157]. PAS⁺ Mφ können auch bei Infektionen mit *Rhodococcus equi*, *Mycobacterium avium* oder Corynebakterien auftreten [128, 157]. Die Diagnose des MW sollte daher nicht auf Basis eines einzelnen Testergebnisses gestellt, sondern stets durch mindestens eine weitere unabhängige Methode bestätigt werden [173]. Hierfür steht bisher der Nachweis mittels *T. whipplei* spezifischer IHC [285] oder die PCR zur Verfügung [16, 23, 168]. Lokalisierte *T. whipplei* Infektionen ohne gastrointestinale Beteiligung können über PAS⁺ Mφ in den Duodenalbiopsien und IHC Färbungen nicht diagnostiziert werden [128]. Sie setzen eine invasive Probenentnahme aus dem betreffenden Gewebe voraus. Für die *T. whipplei* induzierte Endokarditis geht die Sicherung der Diagnose daher meist mit einer Klappenexplantation einher [129, 150]. Um das invasive Procedere bei lokalisierten Infektionen zu minimieren, werden alternative diagnostische Nachweisverfahren zur Bestätigung ungesicherter Infektionen benötigt. Bisher wurden Blut-, Stuhl- und Speichelproben als Ausgangsmaterialien für eine *T. whipplei* spezifische PCR getestet. Die PCR liefert gegenüber der PAS⁺ Färbung im Allgemeinen eine höhere Sensitivität, ist jedoch aufgrund positiver Testergebnisse im Stuhl

und Speichel gesunder Träger in ihrer Spezifität limitiert [20, 23, 151, 152, 286-288]. Der Erregernachweis im Urin lieferte vielversprechende Ergebnisse [289], während die Kultivierung von *T. whipplei* aus den genannten Materialien aufgrund der Generationszeit von 18 Tagen [8] und einer hohen Anzahl kommensaler Bakterien für die Diagnostik des MW nicht geeignet war [22].

Relman *et al.* postulierten den Nachweis von *T. whipplei* DNA im Blut als weitere Alternative zur invasiven Diagnostik [7]. Die Nachweisraten im Vollblut [23] oder in PBMC [166] waren in vorhergehenden Studien gering. Der Nachweis von *T. whipplei* in PBMC lieferte in den Analysen von Marth einen PPW von 100 %, wurde aber durch die geringe Sensitivität limitiert [166]. Die prospektive Pilotstudie dieser Arbeit wies eine Sensitivität von bis zu 80 % und einen PPW von 100 % auf. Diese Daten deuteten darauf hin, dass die *rpoB* RT-PCR aus Fraktionen des Blutes, vor allem aus PBMC, eine geeignete diagnostische Methode ist um die Diagnose des MW in ungesicherten Fällen zu bestätigen. Die Verwendung von PBMC als minimalinvasiv gewonnenes Untersuchungsmaterial hat den Vorteil, dass die Zellzahl exakt bestimmt werden kann. Im Rahmen der Studie war der Einsatz von 2×10^6 PBMC für den Nachweis von *T. whipplei* suffizient. 2×10^6 PBMC entsprechen laut unseren Erfahrungswerten der gewonnenen Zellzahl aus 1 ml Blut gesunder Spender. Dieses geringe Minimalvolumen kann Patienten mit klinischer Instabilität zugutekommen, die aufgrund ihres eingeschränkten Gesundheitsstatus nicht gastroskopiert werden können. Ein weiterer Vorteil der *rpoB* RT-PCR aus PBMC liegt in dem zügigen Abbau bakterieller DNA. Während PAS⁺ Mφ noch nach Jahren der erfolgreichen Behandlung nachweisbar sind [158], wies die *rpoB* RT-PCR aus dem peripheren Blut bei Therapieansprechen nach drei Monaten keine bakterielle DNA nach. Sie ermöglichte somit, im Gegensatz zu den standardisierten Nachweismethoden, die Evaluation des Therapieansprechens von MW-Patienten und eine zeitnahe Detektion wiederkehrender Infektionen.

Der Nachweis bakterieller DNA in 4 MW-Patienten mit einer Antibiose von < 14 Tagen verdeutlichte, dass die *rpoB* RT-PCR auch nach zweiwöchiger Antibiotikatherapie Anwendung finden kann. Patienten mit einer Antibiose > 14 Tagen wurden in die Studie nicht inkludiert, da ein negativer PCR-Befund aufgrund der antibiotischen (Vor-)Behandlung zu falschen Rückschlüssen führen könnte [137, 158, 290]. Die *rpoB* RT-PCR bestätigte den Befund zweier Patienten mit einer *T. whipplei* induzierten Endokarditis. Für einen weiteren Verdachtsfall wurden positive PCR Ergebnisse aus dem Blut erhalten. Dieser Patient wurde aufgrund eines ausstehenden konfirmatorischen Befundes bei nicht erfolgtem Herzklappenersatz aus der Studiauswertung ausgeschlossen. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass der molekulare Erregernachweis aus dem Blut in der Diagnostik des MW Anwendung finden könnte, um lokalisierte Infektion zu bestätigen oder einer Klappentransplantation vorzubeugen.

Zusammenfassend wurde im Zuge der prospektiven Pilotstudie nachgewiesen, dass *T. whipplei* in den Monozyten des peripheren Blutes zirkuliert und diese zur systemischen Ausbreitung der Pathogene beitragen. Der Nachweis bakterieller DNA in der CD14⁺ depletierten Zellfraktion weist auf weitere Wirtszellen für *T. whipplei* hin. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die *rpoB* RT-PCR aus PBMC eine vielversprechende, minimalinvasive Methode ist, die die standardisierte Diagnostik des MW, vor allem bei lokalisierten Infektionen und einer *T. whipplei* Endokarditis, unterstützen kann. In weitergehenden Studien sollte das diagnostische Potential der *rpoB* RT-PCR anhand einer größeren Anzahl an MW-Patienten mit einer isolierten *T. whipplei* Endokarditis, Patienten mit einer positiven Diagnostik aus Urin [291] und gesunden Probanden mit positivem Nachweis von *T. whipplei* in Stuhlproben validiert werden. Zudem sollte der Zeitraum der vollständigen *T. whipplei* Eliminierung unter Antibiotikagabe anhand wiederkehrender Tests und einer höheren Ausgangszellzahl exakter bestimmt und die intraindividuelle Variabilität der Ergebnisse geprüft werden. Die weiterführende

Identifikation von *T. whipplei* assoziierten Wirtszellen ist unabdingbar um die Pathogenese des MW und die systemische Ausbreitung der Erreger besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

1. Whipple, G.H., *A hitherto undescribed disease characterized anatomically by deposits of fat and fatty acids in the intestinal and mesenteric lymph node tissues*. Bull Johns Hopkins Hosp, 1907. **18**: p. 382-91.
2. Black-Schaffer, B., *The tinctoral demonstration of a glycoprotein in Whipple's disease*. Proc Soc Exp Biol Med, 1949. **72**(1): p. 225-7.
3. Cohen, A.S., et al., *Ultrastructural abnormalities in Whipple's disease*. Proc Soc Exp Biol Med, 1960. **105**: p. 411-4.
4. Chears, W.C., Jr. and C.T. Ashworth, *Electron microscopic study of the intestinal mucosa in Whipple's disease. Demonstration of encapsulated bacilliform bodies in the lesion*. Gastroenterology, 1961. **41**: p. 129-38.
5. Yardley, J.H. and T.R. Hendrix, *Combined electron and light microscopy in Whipple's disease. Demonstration of "bacillary bodies" in the intestine*. Bull Johns Hopkins Hosp, 1961. **109**: p. 80-98.
6. Wilson, K.H., et al., *Phylogeny of the Whipple's-disease-associated bacterium*. Lancet, 1991. **338**(8765): p. 474-5.
7. Relman, D.A., et al., *Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease*. N Engl J Med, 1992. **327**(5): p. 293-301.
8. Raoult, D., et al., *Cultivation of the bacillus of Whipple's disease*. N Engl J Med, 2000. **342**(9): p. 620-5.
9. La Scola, B., et al., *Description of Tropheryma whipplei gen. nov., sp. nov., the Whipple's disease bacillus*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 4): p. 1471-9.
10. Raoult, D., et al., *Tropheryma whipplei Twist: a human pathogenic Actinobacteria with a reduced genome*. Genome Res, 2003. **13**(8): p. 1800-9.
11. Maiwald, M., et al., *Environmental occurrence of the Whipple's disease bacterium (Tropheryma whippelii)*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(2): p. 760-2.
12. Silva, M.T., P.M. Macedo, and J.F. Moura Nunes, *Ultrastructure of bacilli and the bacillary origin of the macrophagic inclusions in Whipple's disease*. J Gen Microbiol, 1985. **131**(5): p. 1001-13.
13. Bentley, S.D., et al., *Sequencing and analysis of the genome of the Whipple's disease bacterium Tropheryma whipplei*. Lancet, 2003. **361**(9358): p. 637-44.
14. Maiwald, M., et al., *Reassessment of the phylogenetic position of the bacterium associated with Whipple's disease and determination of the 16S-23S ribosomal intergenic spacer sequence*. Int J Syst Bacteriol, 1996. **46**(4): p. 1078-82.
15. Renesto, P., et al., *Genome-based design of a cell-free culture medium for Tropheryma whippelii*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 447-9.
16. Schneider, T., et al., *Whipple's disease: new aspects of pathogenesis and treatment*. Lancet Infect Dis, 2008. **8**(3): p. 179-90.
17. Dolmans, R.A., et al., *Clinical Manifestations, Treatment, and Diagnosis of Tropheryma whippelii Infections*. Clin Microbiol Rev, 2017. **30**(2): p. 529-555.
18. Fredricks, D.N. and D.A. Relman, *Localization of Tropheryma whippelii rRNA in tissues from patients with Whipple's disease*. J Infect Dis, 2001. **183**(8): p. 1229-37.
19. Dobbins, W.O., 3rd and H. Kawanishi, *Bacillary characteristics in Whipple's disease: an electron microscopic study*. Gastroenterology, 1981. **80**(6): p. 1468-75.

20. Schoniger-Hekele, M., et al., *Tropheryma whipplei* in the environment: survey of sewage plant influxes and sewage plant workers. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(6): p. 2033-5.
21. Crapoulet, N., et al., *Global transcriptome analysis of Tropheryma whipplei* in response to temperature stresses. *J Bacteriol*, 2006. **188**(14): p. 5228-39.
22. Raoult, D., F. Fenollar, and M.L. Birg, *Culture of T. whipplei* from the stool of a patient with Whipple's disease. *N Engl J Med*, 2006. **355**(14): p. 1503-5.
23. Fenollar, F., et al., *Value of Tropheryma whipplei* quantitative polymerase chain reaction assay for the diagnosis of Whipple disease: usefulness of saliva and stool specimens for first-line screening. *Clin Infect Dis*, 2008. **47**(5): p. 659-67.
24. La Scola, B., et al., *Epidemiologic implications of the first isolation and cultivation of Tropheryma whipplei* from a saliva sample. *Ann Intern Med*, 2011. **154**(6): p. 443-4.
25. Bousbia, S., et al., *Tropheryma whipplei* in patients with pneumonia. *Emerg Infect Dis*, 2010. **16**(2): p. 258-63.
26. Fenollar, F., et al., *First isolation of Tropheryma whipplei* from bronchoalveolar fluid and clinical implications. *J Infect*, 2012. **65**(3): p. 275-8.
27. Keita, A.K., et al., *High prevalence of Tropheryma whipplei* in Lao kindergarten children. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015. **9**(2): p. e0003538.
28. Keita, A.K., D. Raoult, and F. Fenollar, *Tropheryma whipplei* as a commensal bacterium. *Future Microbiol*, 2013. **8**(1): p. 57-71.
29. Beltrame, A., et al., *Tropheryma whipplei* intestinal colonization in Italian and migrant population: a retrospective observational study. *Future Microbiol*, 2019. **14**: p. 283-292.
30. Moos, V., et al., *Reduced peripheral and mucosal Tropheryma whipplei*-specific Th1 response in patients with Whipple's disease. *J Immunol*, 2006. **177**(3): p. 2015-22.
31. Raoult, D., et al., *Tropheryma whipplei* in children with gastroenteritis. *Emerg Infect Dis*, 2010. **16**(5): p. 776-82.
32. Bonhomme, C.J., et al., *Serological microarray for a paradoxical diagnostic of Whipple's disease*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2008. **27**(10): p. 959-68.
33. Kalt, A., et al., *Decreased levels of interleukin-12p40 in the serum of patients with Whipple's disease*. *Int J Colorectal Dis*, 2006. **21**(2): p. 114-20.
34. Marth, T., et al., *Defects of monocyte interleukin 12 production and humoral immunity in Whipple's disease*. *Gastroenterology*, 1997. **113**(2): p. 442-8.
35. Moos, V., et al., *Impaired immune functions of monocytes and macrophages in Whipple's disease*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(1): p. 210-20.
36. Marth, T., et al., *Persistent reduction of complement receptor 3 alpha-chain expressing mononuclear blood cells and transient inhibitory serum factors in Whipple's disease*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994. **72**(2): p. 217-26.
37. Ectors, N., et al., *Whipple's disease: a histological, immunocytochemical and electronmicroscopic study of the immune response in the small intestinal mucosa*. *Histopathology*, 1992. **21**(1): p. 1-12.
38. Ghigo, E., et al., *IL-16 promotes T. whipplei* replication by inhibiting phagosome conversion and modulating macrophage activation. *PLoS One*, 2010. **5**(10): p. e13561.
39. Fenollar, F., B. Amphoux, and D. Raoult, *A paradoxical Tropheryma whipplei* western blot differentiates patients with whipple disease from asymptomatic carriers. *Clin Infect Dis*, 2009. **49**(5): p. 717-23.

40. Kowalczevska, M., et al., *Identification of candidate antigen in Whipple's disease using a serological proteomic approach*. Proteomics, 2006. **6**(11): p. 3294-305.
41. Moos, V. and T. Schneider, *Changing paradigms in Whipple's disease and infection with Tropheryma whippelii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011. **30**(10): p. 1151-8.
42. Martinetti, M., et al., *The HLA alleles DRB1*13 and DQB1*06 are associated to Whipple's disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(7): p. 2289-94.
43. Biagi, F., et al., *-295 T-to-C promoter region IL-16 gene polymorphism is associated with Whipple's disease*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015. **34**(9): p. 1919-21.
44. Biagi, F., et al., *Cytokine genetic profile in Whipple's disease*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012. **31**(11): p. 3145-50.
45. Ponz de Leon, M., et al., *Whipple's disease in a father-son pair*. Intern Emerg Med, 2006. **1**(3): p. 254-6.
46. Dykman, D.D., et al., *Whipple's disease in a father-daughter pair*. Dig Dis Sci, 1999. **44**(12): p. 2542-4.
47. Gross, J.B., et al., *Whipple's disease; report of four cases, including two in brothers, with observations on pathologic physiology, diagnosis, and treatment*. Gastroenterology, 1959. **36**(1): p. 65-93.
48. Lagier, J.C., et al., *Evidence of lifetime susceptibility to Tropheryma whippelii in patients with Whipple's disease*. J Antimicrob Chemother, 2011. **66**(5): p. 1188-9.
49. Marth, T., et al., *Tropheryma whippelii infection and Whipple's disease*. Lancet Infect Dis, 2016. **16**(3): p. e13-22.
50. Kanneganti, T.D., M. Lamkanfi, and G. Nunez, *Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 549-59.
51. Kaisho, T. and S. Akira, *Pleiotropic function of Toll-like receptors*. Microbes Infect, 2004. **6**(15): p. 1388-94.
52. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
53. Flannagan, R.S., G. Cosio, and S. Grinstein, *Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(5): p. 355-66.
54. Rosenberger, C.M. and B.B. Finlay, *Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 385-96.
55. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 823-36.
56. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 984-93.
57. Norment, A.M., et al., *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*. Nature, 1988. **336**(6194): p. 79-81.
58. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 401-9.
59. Ziegler, S.F., F. Ramsdell, and M.R. Alderson, *The activation antigen CD69*. Stem Cells, 1994. **12**(5): p. 456-65.
60. Frentsch, M., et al., *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression*. Nat Med, 2005. **11**(10): p. 1118-24.

61. Doyle, C. and J.L. Strominger, *Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion*. 1987. J Immunol, 2010. **184**(11): p. 5935-8.
62. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
63. Hathcock, K.S., et al., *Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function*. J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 631-40.
64. Riha, P. and C.E. Rudd, *CD28 co-signaling in the adaptive immune response*. Self Nonself, 2010. **1**(3): p. 231-240.
65. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
66. Annunziato, F. and S. Romagnani, *Heterogeneity of human effector CD4+ T cells*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(6): p. 257.
67. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
68. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
69. Walker, J.A. and A.N.J. McKenzie, *TH2 cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 121-133.
70. Takeuchi, A. and T. Saito, *CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4(+) T Cells, Their Differentiation and Function*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 194.
71. van de Berg, P.J., et al., *Cytotoxic human CD4(+) T cells*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(3): p. 339-43.
72. Heath, W.R. and F.R. Carbone, *Cytotoxic T lymphocyte activation by cross-priming*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(3): p. 314-8.
73. Carbone, F.R., et al., *Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance*. Immunol Today, 1998. **19**(8): p. 368-73.
74. Embgenbroich, M. and S. Burgdorf, *Current Concepts of Antigen Cross-Presentation*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1643.
75. Gordon, S. and F.O. Martinez, *Alternative activation of macrophages: mechanism and functions*. Immunity, 2010. **32**(5): p. 593-604.
76. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
77. Sica, A. and V. Bronte, *Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1155-66.
78. Scotton, C.J., et al., *Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 beta system by IL-13*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 834-45.
79. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
80. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 901-44.
81. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3733-9.

82. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 453-61.
83. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-7.
84. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.
85. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
86. Lawrence, T. and G. Natoli, *Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 750-61.
87. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
88. Wiktor-Jedrzejczak, W. and S. Gordon, *Cytokine regulation of the macrophage (M phi) system studied using the colony stimulating factor-1-deficient op/op mouse*. Physiol Rev, 1996. **76**(4): p. 927-47.
89. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
90. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
91. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
92. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
93. Edwards, J.P., et al., *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1298-307.
94. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
95. Porcheray, F., et al., *Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(3): p. 481-9.
96. Stout, R.D. and J. Suttles, *Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(3): p. 509-13.
97. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
98. Stout, R.D., et al., *Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 342-9.
99. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
100. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. **23**(11): p. 549-55.
101. Ambarus, C.A., et al., *Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages*. J Immunol Methods, 2012. **375**(1-2): p. 196-206.
102. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.

103. Verreck, F.A., et al., *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(2): p. 285-93.
104. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
105. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
106. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
107. Medzhitov, R. and T. Horng, *Transcriptional control of the inflammatory response*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(10): p. 692-703.
108. Krausgruber, T., et al., *IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 231-8.
109. Fleetwood, A.J., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation*. J Immunol, 2007. **178**(8): p. 5245-52.
110. Charo, I.F., *Macrophage polarization and insulin resistance: PPARgamma in control*. Cell Metab, 2007. **6**(2): p. 96-8.
111. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Orchestration of metabolism by macrophages*. Cell Metab, 2012. **15**(4): p. 432-7.
112. Etzerodt, A. and S.K. Moestrup, *CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(17): p. 2352-63.
113. Buechler, C., et al., *Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(1): p. 97-103.
114. Pesce, J.T., et al., *Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000371.
115. Akagawa, K.S., et al., *Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages*. Respirology, 2006. **11 Suppl**: p. S32-6.
116. Desnues, B., et al., *Whipple disease: intestinal infiltrating cells exhibit a transcriptional pattern of M2/alternatively activated macrophages*. J Infect Dis, 2005. **192**(9): p. 1642-6.
117. Desnues, B., et al., *Whipple's disease: a macrophage disease*. Clin Vaccine Immunol, 2006. **13**(2): p. 170-8.
118. Bai, J.C., et al., *Impaired monocyte function in patients successfully treated for Whipple's disease*. Acta Gastroenterol Latinoam, 1996. **26**(2): p. 85-9.
119. Desnues, B., D. Raoult, and J.L. Mege, *IL-16 is critical for Tropheryma whipplei replication in Whipple's disease*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4575-82.
120. Schinnerling, K., et al., *Regulatory T cells in patients with Whipple's disease*. J Immunol, 2011. **187**(8): p. 4061-7.
121. Bjerknes, R., et al., *Whipple's disease. Demonstration of a persisting monocyte and macrophage dysfunction*. Scand J Gastroenterol, 1988. **23**(5): p. 611-9.
122. Gorvel, L., et al., *Tropheryma whipplei, the Whipple's disease bacillus, induces macrophage apoptosis through the extrinsic pathway*. Cell Death Dis, 2010. **1**: p. e34.

123. Ghigo, E., et al., *Survival of Tropheryma whipplei, the agent of Whipple's disease, requires phagosome acidification*. Infect Immun, 2002. **70**(3): p. 1501-6.
124. Al Moussawi, K., et al., *Type I interferon induction is detrimental during infection with the Whipple's disease bacterium, Tropheryma whipplei*. PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000722.
125. Raoult, D., H. Lepidi, and J.R. Harle, *Tropheryma whipplei circulating in blood monocytes*. N Engl J Med, 2001. **345**(7): p. 548.
126. Dobbins, W.O., 3rd, *HLA antigens in Whipple's disease*. Arthritis Rheum, 1987. **30**(1): p. 102-5.
127. Fleming, J.L., R.H. Wiesner, and R.G. Shorter, *Whipple's disease: clinical, biochemical, and histopathologic features and assessment of treatment in 29 patients*. Mayo Clin Proc, 1988. **63**(6): p. 539-51.
128. Fenollar, F., X. Puechal, and D. Raoult, *Whipple's disease*. N Engl J Med, 2007. **356**(1): p. 55-66.
129. Lagier, J.C., et al., *Systemic Tropheryma whipplei: clinical presentation of 142 patients with infections diagnosed or confirmed in a reference center*. Medicine (Baltimore), 2010. **89**(5): p. 337-45.
130. O'Duffy, J.D., et al., *Whipple's arthritis: direct detection of Tropheryma whippelii in synovial fluid and tissue*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(4): p. 812-7.
131. Schneider, T. and M. Zeitz, *Krankheits- und Immunphänomene bei Morbus Whipple. Differentialdiagnose zu rheumatischen Erkrankungen*. Internist (Berl), 2003. **44**(2): p. 184-190.
132. Glaser, C., et al., *Whipple's disease mimicking rheumatoid arthritis can cause misdiagnosis and treatment failure*. Orphanet J Rare Dis, 2017. **12**(1): p. 99.
133. Moos, V., et al., *Immunopathology of immune reconstitution inflammatory syndrome in Whipple's disease*. J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2354-61.
134. Biagi, F., et al., *Previous immunosuppressive therapy is a risk factor for immune reconstitution inflammatory syndrome in Whipple's disease*. Dig Liver Dis, 2012. **44**(10): p. 880-2.
135. Feurle, G.E., et al., *The immune reconstitution inflammatory syndrome in whipple disease: a cohort study*. Ann Intern Med, 2010. **153**(11): p. 710-7.
136. Compain, C., et al., *Central nervous system involvement in Whipple disease: clinical study of 18 patients and long-term follow-up*. Medicine (Baltimore), 2013. **92**(6): p. 324-30.
137. Feurle, G.E., N.S. Junga, and T. Marth, *Efficacy of ceftriaxone or meropenem as initial therapies in Whipple's disease*. Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 478-86.
138. Gerard, A., et al., *Neurologic presentation of Whipple disease: report of 12 cases and review of the literature*. Medicine (Baltimore), 2002. **81**(6): p. 443-57.
139. Baisden, B.L., et al., *Diagnosis of Whipple disease by immunohistochemical analysis: a sensitive and specific method for the detection of Tropheryma whipplei (the Whipple bacillus) in paraffin-embedded tissue*. Am J Clin Pathol, 2002. **118**(5): p. 742-8.
140. Panegyres, P.K., *Diagnosis and management of Whipple's disease of the brain*. Pract Neurol, 2008. **8**(5): p. 311-7.
141. Puechal, X., *Whipple disease and arthritis*. Curr Opin Rheumatol, 2001. **13**(1): p. 74-9.
142. Testi, I., M.S. Tognon, and V. Gupta, *Ocular Whipple Disease: Report of Three Cases*. Ocul Immunol Inflamm, 2018: p. 1-4.
143. Geissdorfer, W., et al., *High frequency of Tropheryma whipplei in culture-negative endocarditis*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(2): p. 216-22.

144. Fenollar, F., et al., *Tropheryma whippelii* endocarditis. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(11): p. 1721-30.
145. Raoult, D., *Afebrile blood culture-negative endocarditis*. Ann Intern Med, 1999. **131**(2): p. 144-6.
146. Gubler, J.G., et al., *Whipple endocarditis without overt gastrointestinal disease: report of four cases*. Ann Intern Med, 1999. **131**(2): p. 112-6.
147. Chan, V., et al., *Tropheryma whippelii* aortic valve endocarditis without systemic Whipple's disease. Int J Infect Dis, 2011. **15**(11): p. e804-6.
148. Fenollar, F., H. Lepidi, and D. Raoult, *Whipple's endocarditis: review of the literature and comparisons with Q fever, Bartonella infection, and blood culture-positive endocarditis*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(8): p. 1309-16.
149. Geissdorfer, W., et al., *A case of aortic valve disease associated with Tropheryma whippelii infection in the absence of other signs of Whipple's disease*. Infection, 2001. **29**(1): p. 44-7.
150. Mallmann, C., et al., *Fluorescence in situ hybridization to improve the diagnosis of endocarditis: a pilot study*. Clin Microbiol Infect, 2010. **16**(6): p. 767-73.
151. Rolain, J.M., F. Fenollar, and D. Raoult, *False positive PCR detection of Tropheryma whippelii in the saliva of healthy people*. BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 48.
152. Fenollar, F., et al., *Prevalence of asymptomatic Tropheryma whippelii carriage among humans and nonhuman primates*. J Infect Dis, 2008. **197**(6): p. 880-7.
153. Fenollar, F., et al., *Intrafamilial circulation of Tropheryma whippelii, France*. Emerg Infect Dis, 2012. **18**(6): p. 949-55.
154. Schneider, T. and M. Zeitz, *Krankheits- und Immunphänomene bei Morbus Whipple*. Der Internist, 2003. **44**(2): p. 184-190.
155. Feurle, G.E. and T. Marth, *An evaluation of antimicrobial treatment for Whipple's Disease. Tetracycline versus trimethoprim-sulfamethoxazole*. Dig Dis Sci, 1994. **39**(8): p. 1642-8.
156. Edouard, S., F. Fenollar, and D. Raoult, *The rise of Tropheryma whippelii: a 12-year retrospective study of PCR diagnoses in our reference center*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(12): p. 3917-20.
157. Marth, T., *New insights into Whipple's disease - a rare intestinal inflammatory disorder*. Dig Dis, 2009. **27**(4): p. 494-501.
158. von Herbay, A., et al., *Histology of intestinal Whipple's disease revisited. A study of 48 patients*. Virchows Arch, 1996. **429**(6): p. 335-43.
159. Lepidi, H., et al., *Whipple's disease: immunospecific and quantitative immunohistochemical study of intestinal biopsy specimens*. Hum Pathol, 2003. **34**(6): p. 589-96.
160. Maibach, R.C. and M. Altwegg, *Cloning and sequencing an unknown gene of Tropheryma whippelii and development of two LightCycler PCR assays*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003. **46**(3): p. 181-7.
161. Morgenegg, S., F. Dutly, and M. Altwegg, *Cloning and sequencing of a part of the heat shock protein 65 gene (hsp65) of "Tropheryma whippelii" and its use for detection of "T. whippelii" in clinical specimens by PCR*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(6): p. 2248-53.
162. Drancourt, M., A. Carlioz, and D. Raoult, *rpoB sequence analysis of cultured Tropheryma whippelii*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(7): p. 2425-30.
163. Fenollar, F., et al., *Use of genome selected repeated sequences increases the sensitivity of PCR detection of Tropheryma whippelii*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(1): p. 401-3.

164. Fenollar, F., et al., *Quantitative detection of Tropheryma whippiei DNA by real-time PCR*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(3): p. 1119-20.
165. Lehmann, P., et al., *PCR analysis is superior to histology for diagnosis of Whipple's disease mimicking seronegative rheumatic diseases*. Scand J Rheumatol, 2017. **46**(2): p. 138-142.
166. Marth, T., et al., *Limited role for PCR-based diagnosis of Whipple's disease from peripheral blood mononuclear cells*. 1996: Lancet. 1996 Jul 6;348(9019):66-7.
167. Goyo, D., et al., *False-positive PCR detection of Tropheryma whippiei in cerebrospinal fluid and biopsy samples from a child with chronic lymphocytic meningitis*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(11): p. 3783-4.
168. Moter, A., et al., *Validation of an rpoB gene PCR assay for detection of Tropheryma whippiei: 10 years' experience in a National Reference Laboratory*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(11): p. 3858-61.
169. Gunther, U., et al., *Gastrointestinal diagnosis of classical Whipple disease: clinical, endoscopic, and histopathologic features in 191 patients*. Medicine (Baltimore), 2015. **94**(15): p. e714.
170. Guerin, A., et al., *IRF4 haploinsufficiency in a family with Whipple's disease*. Elife, 2018. **7**.
171. Moos, V., C. Loddenkemper, and T. Schneider, *[Tropheryma whippiei infection. Colonization, self-limiting infection and Whipple's disease]*. Pathologe, 2011. **32**(5): p. 362-70.
172. Stroh, T., et al., *Combined pulse electroporation--a novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9488.
173. Gunther, U., et al., *Gastrointestinal diagnosis of classical Whipple disease: clinical, endoscopic, and histopathologic features in 191 patients*. Medicine, 2015. **94**(15): p. 714.
174. Della Bella, S., et al., *Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly*. Clin Immunol, 2007. **122**(2): p. 220-8.
175. Weigt, K., et al., *Whipple's Disease: Diagnostic Value of rpoB Gene PCR from Peripheral Blood Mononuclear Cells*. Mol Diagn Ther, 2018. **22**(4): p. 459-469.
176. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. J Immunol Methods, 2004. **294**(1-2): p. 15-22.
177. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-8.
178. Ferland, C., et al., *IL-16 activates plasminogen-plasmin system and promotes human eosinophil migration into extracellular matrix via CCR3-chemokine-mediated signaling and by modulating CD4 eosinophil expression*. J Immunol, 2004. **173**(7): p. 4417-24.
179. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
180. Spiegelman, S., K.F. Watson, and D.L. Kacian, *Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(11): p. 2843-5.
181. Livak, K.J., et al., *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. PCR Methods Appl, 1995. **4**(6): p. 357-62.
182. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7276-80.
183. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 3.

184. Ulitsky, I., et al., *Expander: from expression microarrays to networks and functions*. Nat Protoc, 2010. **5**(2): p. 303-22.
185. Biesen, R., et al., *Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(4): p. 1136-45.
186. Menssen, A., et al., *SiPaGene: A new repository for instant online retrieval, sharing and meta-analyses of GeneChip expression data*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 98.
187. Smiljanovic, B., et al., *Defining TNF-alpha- and LPS-induced gene signatures in monocytes to unravel the complexity of peripheral blood transcriptomes in health and disease*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(10): p. 1065-79.
188. Grün, J., et al., *Towards a more quantitative view of gene expression profiling with BioRetis and HPCDA: Concepts of High Performance Chip Data Analysis, HPCDA-Score, HPCDA-Volcano-Plot, and Gene List Significance Index (GLSI)*. 2015.
189. Califano, A., G. Stolovitzky, and Y. Tu, *Analysis of gene expression microarrays for phenotype classification*. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol, 2000. **8**: p. 75-85.
190. Dennis, G., Jr., et al., *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. Genome Biol, 2003. **4**(5): p. P3.
191. Trotta, L., et al., *Peripheral T-Cell Reactivity to Heat Shock Protein 70 and Its Cofactor GrpE from Tropheryma whipplei Is Reduced in Patients with Classical Whipple's Disease*. Infect Immun, 2017. **85**(8).
192. Boulos, A., et al., *Molecular evaluation of antibiotic susceptibility of Tropheryma whipplei in axenic medium*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(2): p. 178-81.
193. Boulos, A., J.M. Rolain, and D. Raoult, *Antibiotic susceptibility of Tropheryma whipplei in MRC5 cells*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(3): p. 747-52.
194. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
195. Raoult, D., H. Lepidi, and J.R. Harle, *Tropheryma whipplei circulating in blood monocytes*. 2001: N Engl J Med. 2001 Aug 16;345(7):548.
196. Fenollar, F., et al., *Tropheryma whipplei bacteremia during fever in rural West Africa*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(5): p. 515-21.
197. Li, W., et al., *Genotyping reveals a wide heterogeneity of Tropheryma whipplei*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 2): p. 521-7.
198. Durand, D.V., et al., *Whipple disease. Clinical review of 52 cases. The SNFMI Research Group on Whipple Disease. Societe Nationale Francaise de Medecine Interne*. Medicine (Baltimore), 1997. **76**(3): p. 170-84.
199. Marth, T., et al., *Dysregulated peripheral and mucosal Th1/Th2 response in Whipple's disease*. Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1468-77.
200. Mellati, A.A., *The role of heat shock proteins as chaperones on several human diseases*. Saudi Med J, 2006. **27**(9): p. 1302-5.
201. Assis, L.M., et al., *B-cell epitopes of antigenic proteins in Leishmania infantum: an in silico analysis*. Parasite Immunol, 2014. **36**(7): p. 313-23.
202. Repetto, O., et al., *Differential proteomics of Helicobacter pylori associated with autoimmune atrophic gastritis*. Mol Med, 2014. **20**: p. 57-71.

203. Geelhaar, A., et al., *Specific and nonspecific B-cell function in the small intestines of patients with Whipple's disease*. Infect Immun, 2010. **78**(11): p. 4589-92.
204. Schinnerling, K., et al., *Role of dendritic cells in the pathogenesis of Whipple's disease*. Infect Immun, 2015. **83**(2): p. 482-91.
205. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 298-306.
206. Neumann, E., et al., *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields*. Embo j, 1982. **1**(7): p. 841-5.
207. Trapani, J.A. and M.J. Smyth, *Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(10): p. 735-47.
208. Shafer-Weaver, K., et al., *The Granzyme B ELISPOT assay: an alternative to the 51Cr-release assay for monitoring cell-mediated cytotoxicity*. J Transl Med, 2003. **1**(1): p. 14.
209. Grossman, W.J., et al., *Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 589-601.
210. Pardo, J., et al., *The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation*. Microbes Infect, 2009. **11**(4): p. 452-9.
211. Voskoboinik, I., J.C. Whisstock, and J.A. Trapani, *Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(6): p. 388-400.
212. Lopez, J.A., et al., *Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack*. Blood, 2013. **121**(14): p. 2659-68.
213. Smyth, M.J. and J.A. Trapani, *Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis*. Immunol Today, 1995. **16**(4): p. 202-6.
214. Epple, H.J., et al., *Architectural and functional alterations of the small intestinal mucosa in classical Whipple's disease*. Mucosal Immunol, 2017.
215. van Leeuwen, E.M., et al., *Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1834-41.
216. Zaunders, J.J., et al., *Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2238-47.
217. Aslan, N., et al., *Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis*. J Viral Hepat, 2006. **13**(8): p. 505-14.
218. Thewissen, M., et al., *CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 6514-23.
219. Appay, V., et al., *Characterization of CD4(+) CTL ex vivo*. J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5954-8.
220. van Leeuwen, E.M., et al., *Strong selection of virus-specific cytotoxic CD4+ T-cell clones during primary human cytomegalovirus infection*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3121-7.
221. Brown, D.M., et al., *Multifunctional CD4 cells expressing gamma interferon and perforin mediate protection against lethal influenza virus infection*. J Virol, 2012. **86**(12): p. 6792-803.
222. Hua, L., et al., *Cytokine-dependent induction of CD4+ T cells with cytotoxic potential during influenza virus infection*. J Virol, 2013. **87**(21): p. 11884-93.
223. Feurle, G.E., et al., *HLA B27 and defects in the T-cell system in Whipple's disease*. Eur J Clin Invest, 1979. **9**(5): p. 385-9.

224. Schinnerling, K., *Die Rolle von dendritischen Zellen und T-Zellregulation in der Pathogenese des Morbus Whipple*. 2012.
225. Boussiotis, V.A., et al., *IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients*. J Clin Invest, 2000. **105**(9): p. 1317-25.
226. McGuirk, P., C. McCann, and K.H. Mills, *Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis*. J Exp Med, 2002. **195**(2): p. 221-31.
227. Noel, W., et al., *Alternatively activated macrophages during parasite infections*. Trends Parasitol, 2004. **20**(3): p. 126-33.
228. Ivanov, II and K. Honda, *Intestinal commensal microbes as immune modulators*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(4): p. 496-508.
229. Hayashi, A., et al., *A single strain of Clostridium butyricum induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(6): p. 711-22.
230. Shirey, K.A., et al., *Francisella tularensis live vaccine strain induces macrophage alternative activation as a survival mechanism*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 4159-67.
231. Nau, G.J., et al., *Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1503-8.
232. Akagawa, K.S., *Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages*. Int J Hematol, 2002. **76**(1): p. 27-34.
233. Chistiakov, D.A., et al., *CD68/macrosialin: not just a histochemical marker*. Lab Invest, 2017. **97**(1): p. 4-13.
234. Biswas, S.K. and E. Lopez-Collazo, *Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance*. Trends Immunol, 2009. **30**(10): p. 475-87.
235. Cheadle, W.G., et al., *HLA-DR antigen expression on peripheral blood monocytes correlates with surgical infection*. Am J Surg, 1991. **161**(6): p. 639-45.
236. van den Berk, J.M., et al., *Low HLA-DR expression on monocytes as a prognostic marker for bacterial sepsis after liver transplantation*. Transplantation, 1997. **63**(12): p. 1846-8.
237. Wakefield, C.H., et al., *Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery*. Br J Surg, 1993. **80**(2): p. 205-9.
238. Lekkou, A., et al., *Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections*. Clin Diagn Lab Immunol, 2004. **11**(1): p. 161-7.
239. Geelhaar-Karsch, A., *Analyse des Phänotyps Antigen-präsentierender Zellen und T-Zell Epitopen bei Patienten mit Morbus Whipple*. 2013.
240. Verreck, F.A., et al., *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4560-5.
241. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 915-24.

-
242. Koppelman, B., et al., *Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling*. Immunity, 1997. **7**(6): p. 861-71.
243. Ben Azzouz, E., et al., *Tropheryma whipplei Increases Expression of Human Leukocyte Antigen-G on Monocytes to Reduce Tumor Necrosis Factor and Promote Bacterial Replication*. Gastroenterology, 2018. **155**(5): p. 1553-1563.
244. Schraufstatter, I., et al., *Eosinophils and monocytes produce pulmonary and activation-regulated chemokine, which activates cultured monocytes/macrophages*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(3): p. L494-501.
245. Pivarsci, A., et al., *CC chemokine ligand 18, an atopic dermatitis-associated and dendritic cell-derived chemokine, is regulated by staphylococcal products and allergen exposure*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5810-7.
246. Schutyser, E., A. Richmond, and J. Van Damme, *Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(1): p. 14-26.
247. Adema, G.J., et al., *A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 713-7.
248. Vulcano, M., et al., *Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3843-9.
249. Yoshie, O., T. Imai, and H. Nomiyama, *Chemokines in immunity*. Adv Immunol, 2001. **78**: p. 57-110.
250. Calzada-Wack, J.C., M. Frankenberger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages*. J Inflamm, 1996. **46**(2): p. 78-85.
251. Tsukamoto, M., et al., *CD14(bright)CD16+ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 28.
252. Nishimoto, N. and T. Kishimoto, *Interleukin 6: from bench to bedside*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(11): p. 619-26.
253. Chomarat, P., et al., *IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 510-4.
254. Schreiber, T., et al., *Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 1301-12.
255. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118**(2): p. 503-8.
256. Goerdts, S. and C.E. Orfanos, *Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells*. Immunity, 1999. **10**(2): p. 137-42.
257. Lingnau, M., et al., *Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes*. Hum Immunol, 2007. **68**(9): p. 730-8.
258. Schoedon, G., et al., *Deactivation of macrophages with interleukin-4 is the key to the isolation of Tropheryma whippelii*. J Infect Dis, 1997. **176**(3): p. 672-7.
259. Hashimoto, S., et al., *Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages*. Blood, 1999. **94**(3): p. 837-44.
260. Savitsky, D., et al., *Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(4): p. 489-510.

-
261. Lien, C., et al., *Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(10): p. 4664-8.
262. Lazzari, E. and C.A. Jefferies, *IRF5-mediated signaling and implications for SLE*. Clin Immunol, 2014. **153**(2): p. 343-52.
263. Hu, G., M.E. Mancl, and B.J. Barnes, *Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7403-12.
264. Hu, G. and B.J. Barnes, *IRF-5 is a mediator of the death receptor-induced apoptotic signaling pathway*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2767-77.
265. Weiss, M., et al., *IRF5 is a specific marker of inflammatory macrophages in vivo*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 245804.
266. Takaoka, A., et al., *Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors*. Nature, 2005. **434**(7030): p. 243-9.
267. Krausgruber, T., et al., *IRF5 is required for late-phase TNF secretion by human dendritic cells*. Blood, 2010. **115**(22): p. 4421-30.
268. Barnes, B.J., P.A. Moore, and P.M. Pitha, *Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23382-90.
269. Barnes, B.J., et al., *Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6424-31.
270. Paun, A., et al., *Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection*. PLoS Pathog, 2011. **7**(1): p. e1001246.
271. del Fresno, C., et al., *Interferon-beta production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to C. albicans*. Immunity, 2013. **38**(6): p. 1176-86.
272. Courties, G., et al., *In vivo silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(15): p. 1556-66.
273. Stahl, E.A., et al., *Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci*. Nat Genet, 2010. **42**(6): p. 508-14.
274. Jia, X., et al., *Association of the IRF5 rs2004640 polymorphism with rheumatoid arthritis: a meta-analysis*. Rheumatol Int, 2013. **33**(11): p. 2757-61.
275. Kristjansdottir, G., et al., *Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations*. J Med Genet, 2008. **45**(6): p. 362-9.
276. Sigurdsson, S., et al., *Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(3): p. 528-37.
277. Hellquist, A., et al., *Evidence for genetic association and interaction between the TYK2 and IRF5 genes in systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2009. **36**(8): p. 1631-8.
278. Stone, R.C., et al., *Interferon regulatory factor 5 activation in monocytes of systemic lupus erythematosus patients is triggered by circulating autoantigens independent of type I interferons*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(3): p. 788-98.
279. Dideberg, V., et al., *An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(24): p. 3008-16.

280. Honda, K. and T. Taniguchi, *IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(9): p. 644-58.
281. Negishi, H., et al., *Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15989-94.
282. Terry, R.L. and S.D. Miller, *Molecular control of monocyte development*. Cell Immunol, 2014. **291**(1-2): p. 16-21.
283. Li, H., et al., *Transcriptional Regulation of Macrophages Polarization by MicroRNAs*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1175.
284. Keita, A.K., et al., *Tropheryma whipplei: a common bacterium in rural Senegal*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(12): p. e1403.
285. Lepidi, H., et al., *Immunohistological detection of Tropheryma whipplei (Whipple bacillus) in lymph nodes*. Am J Med, 2002. **113**(4): p. 334-6.
286. Dutly, F., et al., *Tropheryma whippelii DNA in saliva of patients without Whipple's disease*. Infection, 2000. **28**(4): p. 219-22.
287. Street, S., H.D. Donoghue, and G.H. Neild, *Tropheryma whippelii DNA in saliva of healthy people*. Lancet, 1999. **354**(9185): p. 1178-9.
288. Ehrbar, H.U., et al., *PCR-positive tests for Tropheryma whippelii in patients without Whipple's disease*. Lancet, 1999. **353**(9171): p. 2214.
289. Moter, A., et al., *Potential Role for Urine Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Whipple's Disease*. Clin Infect Dis, 2018.
290. Feurle, G.E., et al., *Intravenous ceftriaxone, followed by 12 or three months of oral treatment with trimethoprim-sulfamethoxazole in Whipple's disease*. J Infect, 2013. **66**(3): p. 263-70.
291. Moter, A., et al., *Potential Role for Urine Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Whipple's Disease*. Clin Infect Dis, 2019. **68**(7): p. 1089-1097.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathogenese des MW.....	3
Abbildung 2: Aktivierung von T-Lymphozyten durch APZ.	5
Abbildung 3: Einbettung der Fragestellungen in den immunpathologischen Kontext.	11
Abbildung 4: pGUH Vektorkarte.	17
Abbildung 5: Detaillierte Zusammensetzung der Studienkohorte.	21
Abbildung 6: Gatingstrategie zur Analyse der spezifischen IFN- γ -Expression.....	24
Abbildung 7: Gatingstrategie zur Analyse der Plasmid-Integrität von p86 und pGrpE.	25
Abbildung 8: Prinzip immunhistologischer Färbungen mittels ABC-Methode.....	35
Abbildung 9: Verminderte CD4 ⁺ T-Lymphozyten- Reaktivität gegen TW Lysat, Hsp70 und TW GrpE in MW-Patienten.	37
Abbildung 10: Verminderte Aktivierung der CD8 ⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten.....	37
Abbildung 11: Zellvitalität und Plasmidintegrität nach GrpE Transfektion.	38
Abbildung 12: Induzierte zytotoxische Aktivität der CD8 ⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten nach optimierter Antigen-Präsentation.	39
Abbildung 13: Induzierte Perforinexpression der CD4 ⁺ T-Lymphozyten von MW-Patienten nach optimierter Antigen-Präsentation.	40
Abbildung 14: Die Morphologie <i>in vitro</i> differenzierter M ϕ wird durch <i>T. whipplei</i> nicht beeinflusst.	41
Abbildung 15: Phänotypische Unterscheidung von M ϕ 1 und M ϕ 2.	42
Abbildung 16: <i>T. whipplei</i> Infektionen resultieren in einer Änderung des M ϕ Phänotyps.	45
Abbildung 17: Induktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α in M1pTW und M1pBCG.....	47
Abbildung 18: Keine Beeinflussung der extrazellulären Replikation durch IL-10 und TNF- α	49
Abbildung 19: RIN-Werte der mRNA für Mikroarray-Analysen.....	50
Abbildung 20: Expressionsintensitäten prozessierter Agilent Chips.	51
Abbildung 21: Induzierte und reprimierte IDs der Vergleiche 1-8.	52
Abbildung 22: Venn-Diagramme der Vergleiche 1-4 und 5-8.....	56
Abbildung 23: Expressionswerte von IRF5, NOP10, HSPA1A und STAT6.	57
Abbildung 24: Annotationscluster der Vergleiche 1-8.....	58
Abbildung 25: Keine Unterschiede in der IRF4 Expression zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen.	59
Abbildung 26: CT-Wert basierte Entscheidung für PBMC als präferiertes Untersuchungsmaterial.	62
Abbildung 27: Nachweis eines atypischen MW anhand von Duodenalbiopsien, Lymphknoten und der Herzklappe.	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Gegenüberstellung klassisch aktivierter (M1) und alternativ aktivierter (M2) Mφ.	6
Tabelle 2:	Technische Geräte.	12
Tabelle 3:	Verbrauchsmaterialien.	13
Tabelle 4:	Chemikalien.	14
Tabelle 5:	Zusammensetzung verwendeter Puffer, Medien und Lösungen.	14
Tabelle 6:	Testsysteme (Kits) und Enzyme.	15
Tabelle 7:	Oligonukleotide.	16
Tabelle 8:	Vektoren.	16
Tabelle 9:	Bakterienstämme.	17
Tabelle 10:	Antigene und Stimulanzen.	17
Tabelle 11:	Zytokine und Wachstumsfaktoren.	18
Tabelle 12:	Primärantikörper für die Immunhistochemie.	18
Tabelle 13:	Antikörper für die Durchflusszytometrie.	18
Tabelle 14:	Antikörper für die magnetische Zellisolation.	19
Tabelle 15:	Analysiertes Probenmaterial.	20
Tabelle 16:	Software.	21
Tabelle 17:	Anregungs- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome.	28
Tabelle 18:	Reaktionsansatz der SuperScript™ III Reverse Transkriptase vermittelten cDNA Synthese.	30
Tabelle 19:	Reaktionsansatz der <i>rpoB</i> RT-PCR.	31
Tabelle 20:	Reaktionsprogramm der <i>rpoB</i> RT-PCR.	31
Tabelle 21:	Expressionstendenzen der Mφ-Marker CD14, CD16, CD68, CD163, HLA-DR und CCL-18 nach Stimulation.	46
Tabelle 22:	CT-Werte der <i>rpoB</i> RT-PCR zur Analyse der intrazellulären <i>T. whipplei</i> Replikation.	48
Tabelle 23:	Top 5 HPCDA-Scores der Vergleiche 1-4.	53
Tabelle 24:	Top 5 HPCDA-Scores der Vergleiche 5-8.	54
Tabelle 25:	Top 20 aller 138 signifikanten IDs der Vergleiche 1-4.	56
Tabelle 26:	Funktionelle Annotationscluster der Vergleiche 1-8.	60
Tabelle 27:	Charakterisierung der Patientenpopulation und Zusammenfassung der PCR- und Histologie-Ergebnisse.	63

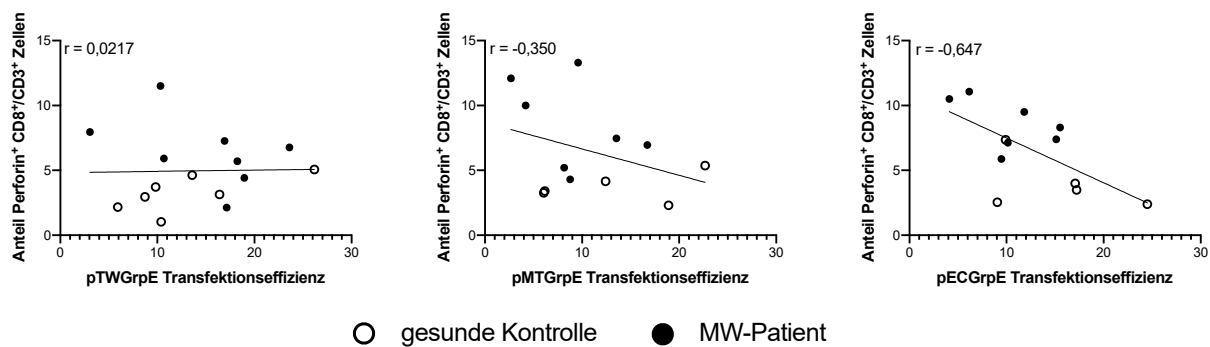
Anhangsverzeichnis

Anhang 1:	Korrelationsanalyse.	XXIII
Anhang 2:	<i>rpoB</i> RT-PCR zum Nachweis bakterieller cDNA_Lauf1.	XXIV
Anhang 3:	<i>rpoB</i> RT-PCR zum Nachweis bakterieller cDNA_Lauf2.	XXV
Anhang 4:	Probenbelegung der Agilent Chips und Darstellung der durchgeführten Vergleiche.	XXVI
Anhang 5:	HPCDA-Volcano Plots der Mikroarrayvergleiche 1-4.	XXVII
Anhang 6:	HPCDA-Volcano Plots der Mikroarrayvergleiche 5-8	XXVIII
Anhang 7:	Top 50 der 3301 differenziell exprimierten Gene von Mφ1 MW-Patienten und gesunden Kontrollen.	XXIX
Anhang 8:	138 differenziell exprimierte IDs zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen.	XXXI
Anhang 9:	Annotationscluster der Vergleiche 1-8.....	XXXV

Anhang

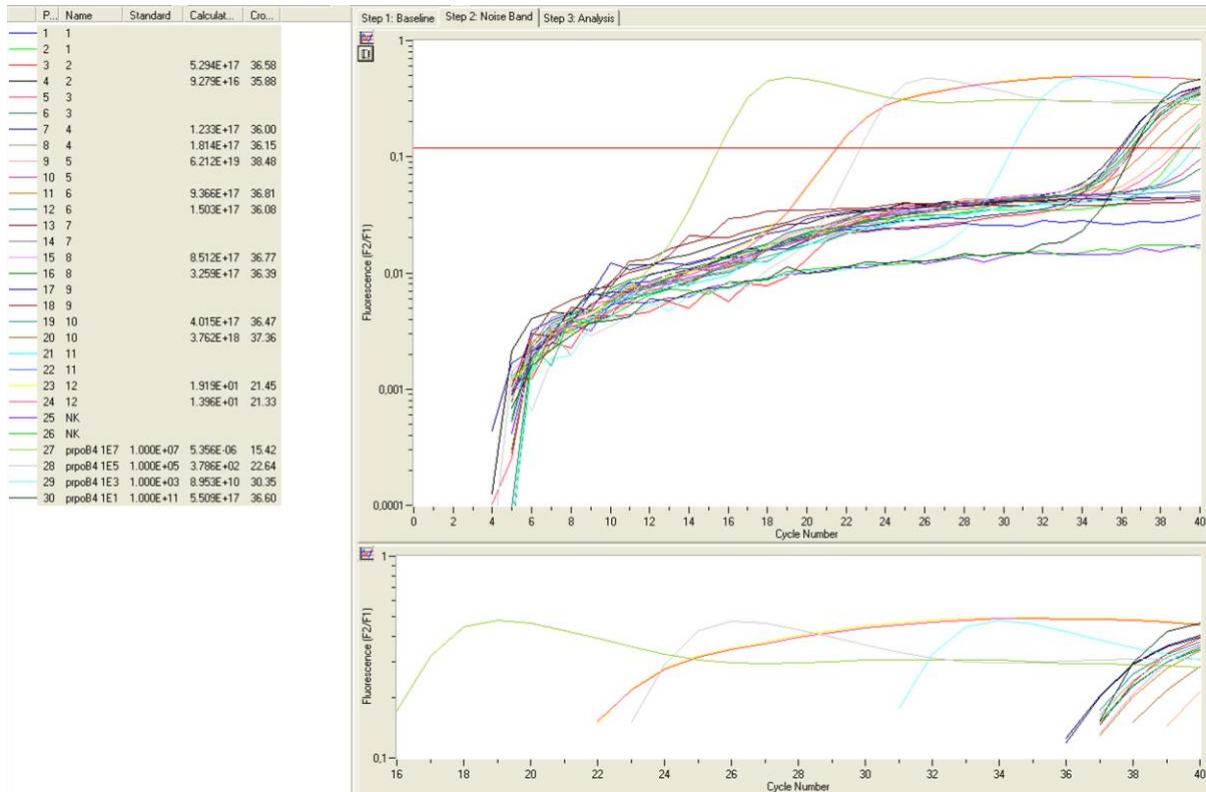
Anhang 1: Korrelationsanalyse.

Dargestellt ist die Korrelation des Anteils Perforin⁺ CD3⁺/CD8⁺ T-Lymphozyten mit der Transfektionseffizienz. pTWGrpE: Plasmid mit GrpE von *T. whipplei*; pMTGrpE: Plasmid mit GrpE von *M. tuberculosis*; pECGrpE: Plasmid mit GrpE von *E. coli*.



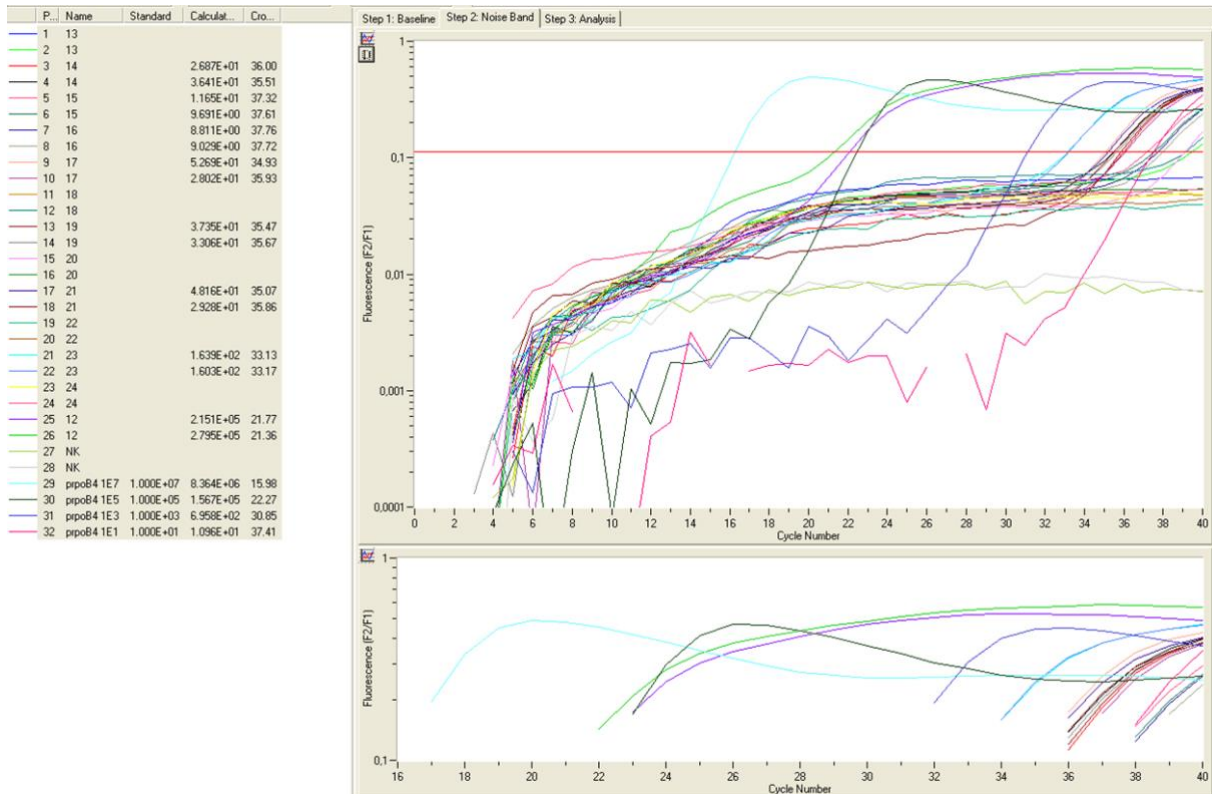
Anhang 2: *rpoB* RT-PCR zum Nachweis bakterieller cDNA_Lauf1.

Der Nachweis bakterieller RNA erfolgte am LightCycler 2.0. Dargestellt ist der Screenshot des ersten von zwei Durchläufen zur Analyse des Einflusses verschiedener Zytokine auf die intrazelluläre *T. whipplei* Replikation. Probe 1+2 (Sample Name 1): Mφ1, ohne Zytokin, T7; Probe 3+4 (Sample Name 2): M1pTW, ohne Zytokin, T0; Probe 5+6 (Sample Name 3): M1pTW, ohne Zytokin, T7; Probe 7+8 (Sample Name 4): M1pTW, Thioredoxin, T0; Probe 9+10 (Sample Name 5): M1pTW, Thioredoxin, T7*; Probe 11+12 (Sample Name 6): M1pTW, Anti-IL-16, T0; Probe 13+14 (Sample Name 7): M1pTW, Anti-IL-16, T7; Probe 15+16 (Sample Name 8): M1pTW, IFN-γ, T0; Probe 17+18 (Sample Name 9): M1pTW, IFN-γ, T7; Probe 19+20 (Sample Name 10): M1pTW, IL-1β, T0; Probe 21+22 (Sample Name 11): M1pTW, IL-1β, T7; Probe 23+24 (Sample Name 12): Positivkontrolle 1; Probe 25+26 (Sample Name NK): Negativkontrolle; Probe 27: prpoB4 Plasmidstandard, 1*10⁷ Kopien; Probe 28: prpoB4 Plasmidstandard, 1*10⁵ Kopien; Probe 29: prpoB4 Plasmidstandard, 1*10³ Kopien; Probe 30: prpoB4 Plasmidstandard, 1*10¹ Kopien. * Eine Wiederholung des PCR Laufs mit Probe 10 wies keine bakterielle cDNA nach.



Anhang 3: *rpoB* RT-PCR zum Nachweis bakterieller cDNA_Lauf2.

Der Nachweis bakterieller RNA erfolgte am LightCycler 2.0. Dargestellt ist der Screenshot des zweiten Durchlaufs zur Analyse des Einflusses verschiedener Zytokine auf die intrazelluläre *T. whipplei* Replikation. Probe 1+2 (Sample Name 13): Mφ1, ohne Zytokin, T7; Probe 3+4 (Sample Name 14): M1pTW, ohne Zytokin, T0; Probe 5+6 (Sample Name 15): M1pTW, ohne Zytokin, T7; Probe 7+8 (Sample Name 16): M1pTW, TNF-α, T0; Probe 9+10 (Sample Name 17): M1pTW, TNF-α, T7; Probe 11+12 (Sample Name 18): Mφ2, ohne Zytokin, T7; Probe 13+14 (Sample Name 19): M2pTW, ohne Zytokin, T0; Probe 15+16 (Sample Name 20): M2pTW, ohne Zytokin, T7; Probe 17+18 (Sample Name 21): M2pTW, IL-16, T0; Probe 19+20 (Sample Name 22): M2pTW, IL-16, T7; Probe 21+22 (Sample Name 23): M2pTW, IL-10, T0; Probe 23+24 (Sample Name 24): M2pTW, IL-10, T7; Probe 25+26 (Sample Name 12): Positivkontrolle; Probe 27+28 (Sample Name NK): Negativkontrolle; Probe 29: prpoB4 Plasmidstandard, 1*10⁷ Kopien; Probe 30: prpoB4 Plasmidstandard, 1*10⁵ Kopien; Probe 31: prpoB4 Plasmidstandard, 1*10³ Kopien; Probe 32: prpoB4 Plasmidstandard, 1*10¹ Kopien.



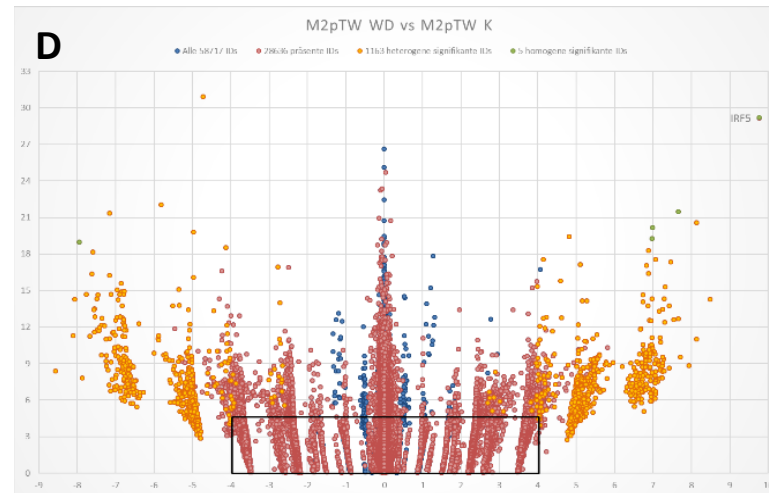
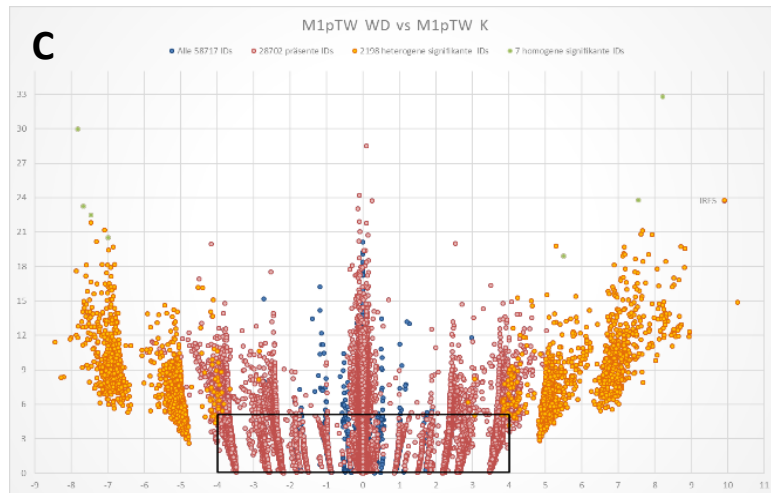
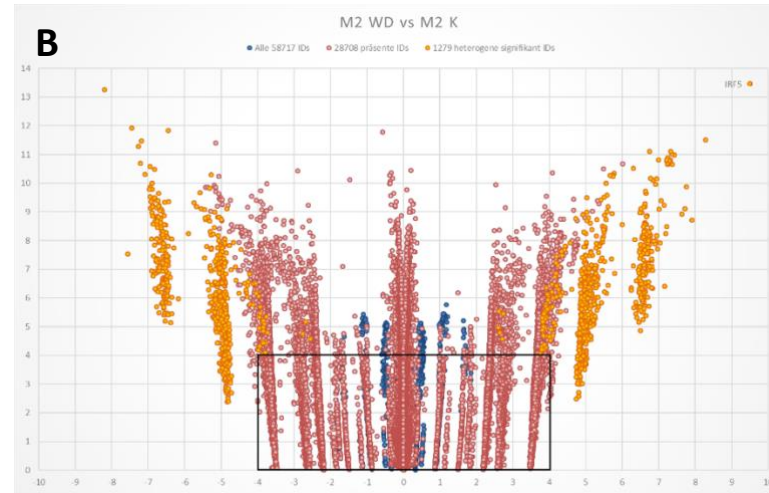
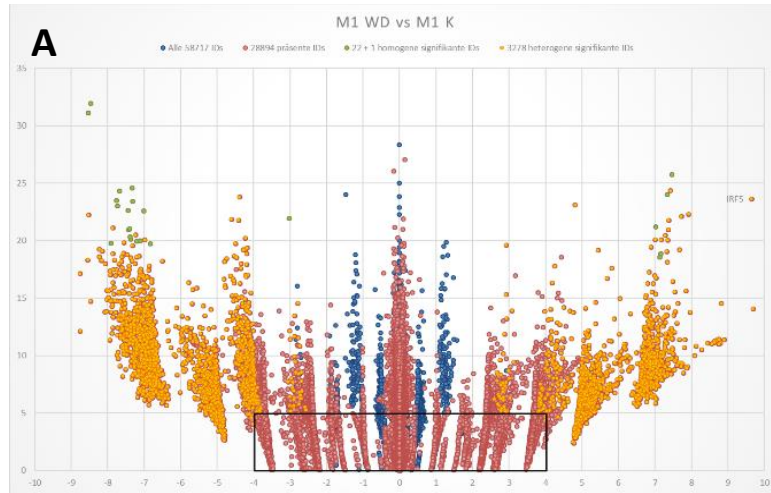
Anhang 4: Probenbelegung der Agilent Chips und Darstellung der durchgeführten Vergleiche.

Tabellarische Darstellung der analysierten Proben der Vergleiche 1-8. Exp: Experiment; Base: Baseline; K: gesunde Kontrollen; MW: MW-Patienten.

Chip	Zustand	Vergleich							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1+2	Mφ1 (K)	Base				Base			
3+4	Mφ1 (MW)	Exp					Base		
5+6	Mφ2 (K)		Base					Base	
7+8	Mφ2 (MW)		Exp						Base
9+10	M1pTW (K)			Base		Exp			
11+12	M1pTW (MW)			Exp			Exp		
13+14	M1pTW (MW)				Base			Exp	
15+16	M2pTW (K)				Exp				Exp

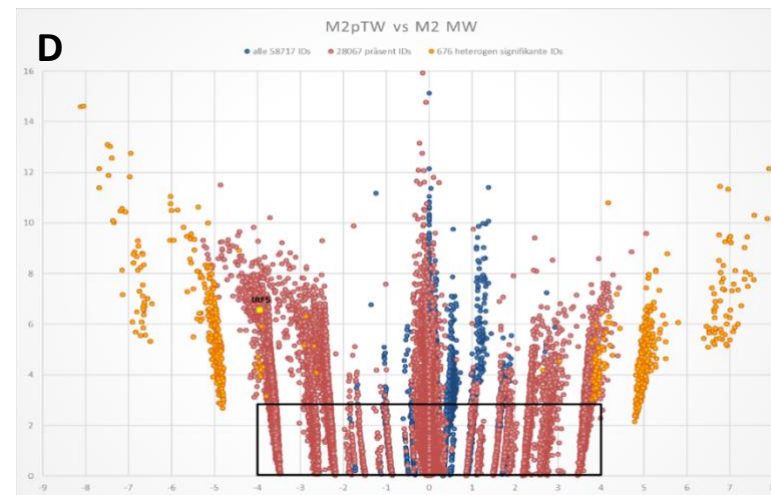
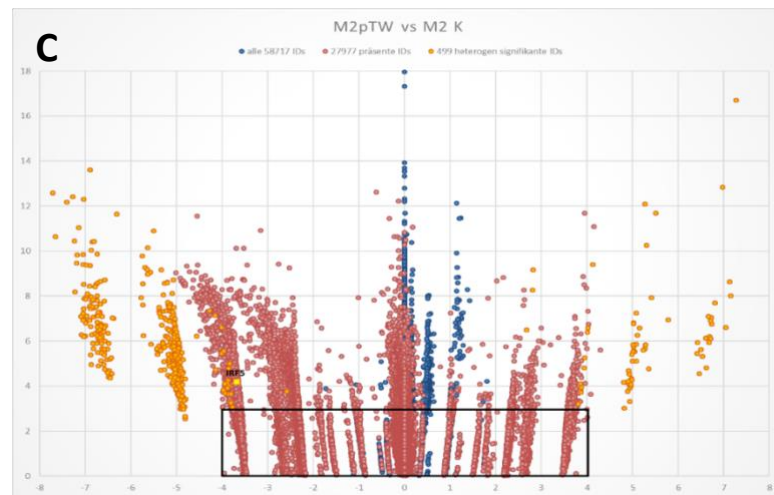
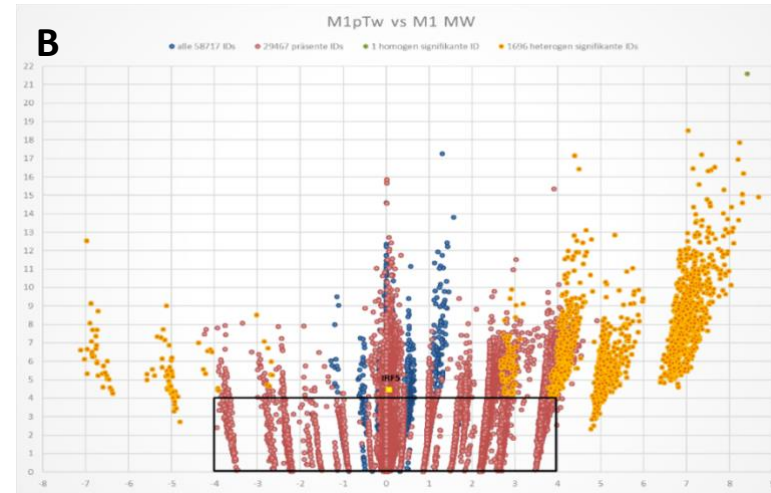
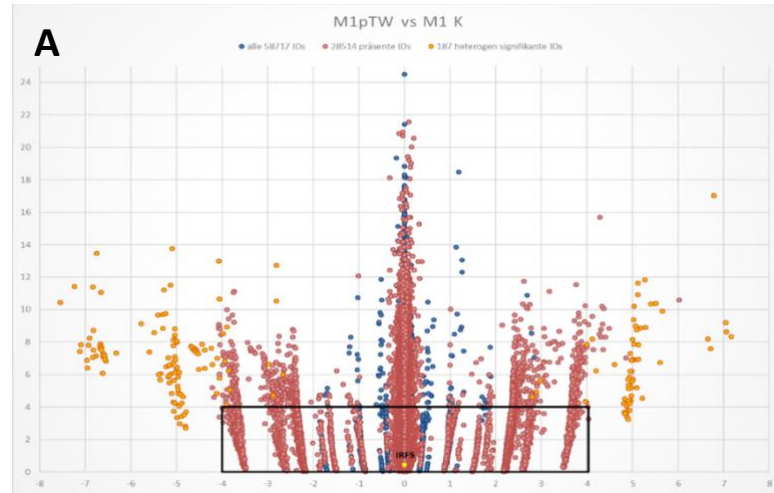
Anhang 5: HPCDA-Volcano Plots der Mikroarrayvergleiche 1-4.

Dargestellt ist der Fold change (x-Achse) gegen den p-Value (y-Achse) aller 58717 Agilent IDs der Vergleiche M1 MW gegen M1 K (A), M2 MW gegen M2 K (B), M1pTW MW gegen M1pTW K (C) sowie M2pTW MW gegen M2pTW K (D). Der schwarze Quadrant dient der Abgrenzung statistisch nicht signifikanter Gene. Homolog signifikante Gene (grün) wiesen nach strikter Bonferroni-Korrektur signifikante p-Werte auf. Heterogen signifikante Gene (orange) sind ebenfalls signifikant, bestanden jedoch keinen Bonferroni korrigierten t-Test.



Anhang 6: HPCDA-Volcano Plots der Mikroarrayvergleiche 5-8

Dargestellt ist der Fold change (x-Achse) gegen den p-Value (y-Achse) aller 58717 Agilent IDs der Vergleiche M1pTW gegen M1 K (A), M1pTW gegen M1 MW (B), M2pTW gegen M2 K (C) sowie M2pTW gegen M2 MW (D). Statistisch nicht signifikante Gene sind innenliegend des Quadrants abgegrenzt. Die Infektion der M1 Mφ von MW-Patienten mit *T. whipplei* resultierte in einer starken Induktion der Genexpression. IRF5: Interferon regulatorischer Faktor 5.



Anhang 7: Top 50 der 3301 differenziell exprimierten Gene von Mφ1 MW-Patienten und gesunden Kontrollen.

Die Sortierung erfolgte nach absteigendem HPCDA-Score. ↑: Gen in MW-Patienten hochreguliert; ↓: Gen in MW-Patienten herunterreguliert.

Gensymbol	Funktion	HPCDA-Score
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	2144,88 ↑
TSEN54	TRNA Splicing Endonuklease Untereinheit 54	2073,86 ↓
lnc-KIDINS220-6	Nicht kodierende RNA	1948,86 ↓
GUSB	β-Glukuronidase	1919,66 ↓
IRF5	Interferon regulatorischer Faktor 5	1869,66 ↑
LOC642423	Nicht kodierende RNA	1848,54 ↓
HLA-B	MHC-Klasse-I B	1838,28 ↓
CCL1	CC-Chemokine Ligand 1	1648,31 ↓
lnc-CCDC93-3	Nicht kodierende RNA	1632,74 ↓
ZSCAN12P1	Zink-Finger and SCAN Domäne mit Pseudogen 1, nicht kodierende RNA	1621,42 ↓
SSTR3	Somatostatin Rezeptor 3	1598,05 ↓
FRMPD3	FERM und PDZ Domäne	1590,67 ↓
NOP10	Ribonukleoprotein	1588,79 ↓
FN3K	Fruktosamin 3 Kinase	1583,86 ↓
lnc-COL4A2-3	Nicht kodierende RNA	1570,00 ↓
lnc-AC092811.1-1	Nicht kodierende RNA	1557,07 ↓
ENST00000547114	Unbekannt	1556,00 ↓
SARS	Seryl-tRNA Synthetase	1543,47 ↓
CARD14	Familie der Caspase Rekrutierungsfamilie	1536,25 ↓
lnc-NADSYN1-1	Nicht kodierende RNA	1505,29 ↓
lnc-TP53INP1-1	Nicht kodierende RNA	1478,93 ↓
LOC727993	Unbekannt	1464,74 ↓
lnc-TMEM18-11	Nicht kodierende RNA	1438,64 ↓
TMEM95	Transmembranprotein 95	1420,48 ↓
BC039705	Unbekannt	1412,80 ↓
LOC400958	Unbekannt	1409,87 ↓
GS1-24F4.2	Unbekannt	1403,07 ↓
lnc-FAH-1	Unbekannt	1402,31 ↑
CSRP2	Cystein- und Glycinreiches Protein 2	1394,78 ↑
DLEU1-AS1	DLEU1 Antisense RNA 1	1363,44 ↓
CSH2	Chorionisches Somatomammotropin Hormon 2	1352,52 ↓

Anhang

Gensymbol	Funktion	HPCDA-Score
Inc-BATF3-2	Nicht kodierende RNA	1344,33 ↓
Inc-AL445989.1-2	Nicht kodierende RNA	1337,53 ↓
EMILIN1	Elastin Microfibrillen Interfacer 1	1331,15 ↓
Inc-CBLB-4	Nicht kodierende RNA	1304,86 ↓
LRRIQ3	Leucin-reiche Wiederholung und IQ Motiv 3	1299,96 ↓
SIGLEC14	Sialinsäure bindendes Ig-ähnliches Lectin 14	1293,77 ↓
ENST00000555016	Unbekannt	1293,75 ↓
TRIM54	Tripartit Motiv 54	1285,31 ↓
PCAT19	Prostatatrebs assoziiertes Transkript 19	1275,38 ↓
SLC17A7	Lösliche Carrier Familie 17 (vesikulärer Glutamat-Transporter)	1272,69 ↓
ENST00000577773	Unbekannt	1259,30 ↓
BST1	Knochenmark Stroma Antigen 1	1252,88 ↑
ACTA2-AS1	Nicht kodierende RNA	1241,87 ↓
IL4I1	Interleukin 4 induziertes Gen 1	1241,61 ↑
CCL4L2	CC-Chemokine Ligand 4-like 2	1238,56 ↑
HLA-DPB1	MHC-Klasse-II DP-β-1	1236,37 ↑
Inc-STX17-1	Nicht kodierende RNA	1235,99 ↓
XLOC_l2_003856	Unbekannt	1235,85 ↓

Anhang 8: 138 differenziell exprimierte IDs zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen.

Gelistet sind alle 138 unabhängig vom Mφ-Subtyp und der Präsenz von *T. whipplei* differenziell exprimierte IDs zwischen MW-Patienten und gesunden Kontrollen (Vergleich 1-4). Das Ranking erfolgte nach absteigendem HPCDA-Score. AvgSign: Average Sign, durchschnittlicher Signalwert aller vier Einzelvergleiche; ↑: Gen in MW-Patienten hochreguliert; ↓: Gen in MW-Patienten herunterreguliert.

Gensymbol	Funktion	AvgSign HPCDA-Score
IRF5	Interferon regulatorischer Faktor 5	1984,30 ↑
NOP10	Ribonukleoprotein	1767,65 ↓
PIH1D1	PIH1 Domäne (PIH1D1)	869,97 ↓
HSPA1A	Hitzeschockprotein 70kDa, 1A	857,55 ↑
ST6GAL1	ST6-β-Galaktosamid α-2,6-Sialyltransferase 1	839,46 ↑
B3GALTL	β-1,3-Glaktosyltransferase	791,47 ↑
CSRP2	Cystein- und Glycinreiches Protein 2	786,05 ↑
CBS	Cystathionin-β-Synthase	765,99 ↓
STAT6	Transkriptionsfaktor, IL-4 induziert	724,00 ↑
PPIL3	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase-like 3	719,49 ↓
MMP12	Matrix Metallopeptidase 12	717,12 ↑
LINC00649	Nicht kodierende RNA	703,82 ↓
EMILIN1	Elastin Mikrofibril Interfacer 1	693,14 ↓
LOC100132077	Unbekannt	649,47 ↑
AK090765	<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ33446 fis	648,71 ↑
TMEM114	Transmembranprotein 114	638,26 ↓
MTERF4	Mitochondrialer Transkription-Termination Faktor 4	632,31 ↑
SIRPB2	Signalregulatorisches Protein β2	626,90 ↑
NDRG1	N-myc downstream reguliert 1	619,30 ↑
PSD3	Pleckstrin und Sec7 Domäne 3	540,76 ↑
AK127786	<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ45887 fis	536,96 ↓
KNSTRN	Kinetochore-lokalisiertes Astrin/SPAG5 Bindeprotein	609,64 ↓
CAPN15	Kalpain 15	591,24 ↓
STK32C	Serine/Threonin Kinase 32C	574,91 ↓
CTSV	Cathepsin V	571,80 ↓
UHRF1BP1	UHRF1 Bindeprotein 1	569,99 ↓
LINC01503	Nicht kodierende RNA	569,94 ↓
DDX43	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptid 43	558,58 ↑
CD33	CD33 Molekül	536,66 ↑
TIMM10	Translokase der inneren Mitochondrialmembran 10, homolog (Hefe)	516,99 ↓

Gensymbol	Funktion	AvgSign HPCDA-Score
PAX8-AS1	PAX8 Antisense RNA 1	515,54 ↓
Inc-ZNF8-1	Unbekannt	498,33 ↓
MS4A14	Membran-Spannungsdomäne 4	498,07 ↑
STAG3	Stromal Antigen 3	497,48 ↑
AP3S2	Adaptorbezogener Protein-Komplex 3, Sigma Untereinheit2	491,36 ↓
RASA4B	RAS p21 Protein Aktivator 4B	485,39 ↑
KDELRL2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) Endoplasmisches Retikulum Protein Rezeptor 2	481,27 ↓
ERAP1	Endoplasmisches Retikulum Aminopeptidase 1	480,53 ↑
FAM90A1	Nicht kodierende RNA	470,03 ↑
CENPP	Zentromer Protein P	463,48 ↑
ENST00000607355	Unbekannt	460,91 ↓
CCDC144A	Coiled-Coil Domäne mit Bereich 144A	450,21 ↑
FAM224A	Nicht kodierende RNA	448,68 ↓
CFLAR	CASP8 und FADD-ähnlicher Apoptose Regulator	444,12 ↓
AMZ1	Archaelysin Familie Metallopeptidase 1	441,82 ↑
ARL4C	ADP-Ribosylation Faktor-like 4C	439,23 ↑
HSPA6	Hitzeschockprotein 70kDa	438,74 ↑
GATM	Glycin Amidinotransferase	438,28 ↑
ZNF124	Zink-Finger Protein 124	430,83 ↓
TMEM229B	Transmembran Protein 229B	425,43 ↓
DDX11L16	Nicht kodierende RNA	394,28 ↑
ENST00000445752	Coiled-Coil Domäne mit Bereich 144B	392,66 ↑
SERPINB9	Serpin-Peptidase-Inhibitor, Clade B (Ovalbumin), Mitglied 9	387,59 ↑
GLB1L	Galactosidase-β-1	387,27 ↑
C19orf81	Chromosome 19 ORF 81	383,33 ↓
GTSF1	Gametozyten spezifischer Faktor	365,31 ↓
GSG1	Keimzell-spezifisches Gen 1	364,11 ↓
LOC403323	Unbekannt	362,86 ↑
C3	Komplement Komponente 3	357,65 ↓
NAIP	NLR Familie, Apoptosie inhibierendes Protein	357,09 ↑
LARGE	Like-Glykosyltransferase, mRNA	350,28 ↓
BAIAP2-AS1	Nicht kodierende RNA	343,63 ↑
TMTC1	Transmembran O-Mannosyltransferase	337,59 ↑

Anhang

Gensymbol	Funktion	AvgSign HPCDA-Score
MIPEPP3	Mitochondriale intermediäre Peptidase, Pseudogene 3	335,71 ↑
SEZ6L2	Seizure verwandtes Homolog 6	332,89 ↓
XLOC_I2_012847	Unbekannt	324,20 ↑
ZSWIM7	Zink-Finger, SWIM-Typ 7	318,41 ↑
AOC1	Ominoxidase	318,01 ↓
SH3D21	SH3 Domäne mit Bereich 21	312,62 ↑
MIR503HG	Nicht kodierende RNA	311,70 ↓
DOPEY2	Dopey Familienmitglied 2	311,34 ↓
A_32_P88905	Unbekannt	304,61 ↓
ST6GALNAC2	ST6 (Alpha-N-Acetyl-Neuraminy-2,3-β-Galactosyl-1,3)-N-Acetylgalactosaminid Alpha-2,6-Sialyltransferase 2	294,90 ↓
HLA-J	Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-I, J	294,23 ↑
FLJ32255	Nicht kodierende RNA	293,82 ↓
Inc-AF165138.7.1-1	Unbekannt	291,79 ↑
SULF2	Sulfatase 2	289,97 ↓
TMA7	Translationsmaschinerie assoziiertes Homolog 7	283,36 ↓
PPA1	Pyrophosphatase 1	279,94 ↑
ZNF667-AS1	Nicht kodierende RNA	270,95 ↓
XLOC_I2_015295	Unbekannt	269,78 ↑
SLC28A3	Gelöste Trägerfamilie 28, Mitglied 3	266,72 ↑
ZNF322	Zink-Finger Protein 322	266,55 ↓
NGFRAP1	Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor assoziiertes Protein 1	254,04 ↑
MTMR9LP	Nicht kodierende RNA	242,82 ↑
STOX2	Storkhead Box 2	235,26 ↓
CFH	Komplementfaktor H	220,84 ↑
ARPC5	Aktin verwandter Protein 2/3 Komplex, Untereinheit 5	218,77 ↓
CCL28	Chemokin (C-C Motif) Ligand 28	198,25 ↑
SEMA4D	Semaphorin 4D (CD100)	188,83 ↑
ZNF815P	Zink-Finger Protein 815, nicht kodierende RNA	184,67 ↓
TOR3A	Torsin Familie 3, Mitglied A	181,50 ↑
CNN2	Calponin 2	177,62 ↓
CCL13	Chemokin (C-C Motif) Ligand 13 (CCL13)	175,08 ↑
CPVL	Serin Carboxypeptidase	171,86 ↑
HPGD	Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15	170,51 ↑

Anhang

Gensymbol	Funktion	AvgSign HPCDA-Score
TCN2	Transkobalamin II	168,09 ↑
GGT1	Gamma-Glutamyltransferase 1	163,36 ↑
Inc-FAM72C-2	Unbekannt	157,03 ↓
GGT3P	Nicht kodierende RNA	156,52 ↑
CAPN3	Calpain 3	154,67 ↑
LOC101060091	Nicht kodierende RNA	154,08 ↑
CD37	CD37	150,84 ↓
FADS1	Fettsäuresaturase 1	147,88 ↑
HDDC2	Bereich 2 enthaltende HD Domäne	144,65 ↓

Anhang 9: Annotationscluster der Vergleiche 1-8.

Tabellarische Darstellung der Annotationscluster mit einem der Vergleiche 1-8. Das Ranking innerhalb eines Vergleichs erfolgte nach absteigendem Enrichment Score.

Cluster	Term	Enrichment Score
Vergleich 1: Mφ1 MW-Patienten vs. Kontrollen		
1	Glykoproteine	8,27
2	Membran	4,56
3	Immunität	4,25
4	Immunglobuline	4,13
5	Cadherine	3,98
6	MHC-Komplexe	3,61
7	Heparin-Bindung	2,27
8	Cholesterol-Metabolismus	2,25
9	Lysosomen	2,20
10	Blutgerinnung	2,04
11	ITIM Motiv	1,96
12	Antivirale Immunantwort	1,93
13	Collagen	1,80
14	Ig-like C2 Domäne	1,57
15	Kalzium-Bindung	1,51
16	Kazal Domäne	1,50
17	Interferon Signaling	1,45
18	EGF-like Domäne	1,38
Vergleich 2: Mφ2 MW-Patienten vs. Kontrollen		
1	Immunität	3,90
2	Glykoproteine	3,59
3	Interferon Signaling	2,91
4	SH2 Domäne	2,79
5	Membran	2,67
6	Procadherine	2,13
7	Adaptive Immunantwort	2,04
8	MHC Komplexe	1,96
9	Protease Inhibitoren	1,91
10	Cadherine	1,90

Cluster	Term	Enrichment Score
11	Molybdenum Kofaktor Biosynthese	1,72
12	Leukorien-Biosnythese	1,62
13	Oxidoreduktasen	1,57
14	Aktin-Bindung	1,48
15	Transmembrantransport	1,41
16	Zellmembran	1,39
17	STAT Transkriptionsfaktor	1,37
18	Rhodanese	1,33
Vergleich 3: M1pTW MW-Patienten vs. Kontrollen		
1	Immunität	8,28
2	Glykoproteine	6,54
3	Membran	4,56
4	MHC Komplex	4,47
5	Hydroxylierung	2,86
6	Zytokine	2,73
7	Cystein Peptidasen	2,55
8	Oxireduktasen	2,42
9	Glykolyse	2,35
10	Chemokine	2,20
11	Hydroxylierung	2,05
12	Glutathion-Metabolismus	1,90
13	Immunglobuline	1,85
14	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)	1,85
15	Zytochrom B5 Bindedomäne	1,83
16	Virus-Wirt-Interaktion	1,83
17	Proteasen	1,73
18	Metallothioneine	1,64
19	Proteinaseinhibitoren	1,49
20	Metalloproteasen	1,48
21	Leucin-Zipper Domäne	1,43
22	Caspase-Aktivierung und Rekrutierung (CARD)	1,43
23	NOD-like Rezeptor Pathway	1,42

Vergleich 4: M2pTW MW-Patienten vs. Kontrollen		
1	Metallothionin	5,99
2	Glykoproteine	4,71
3	Membran	3,69
4	Zellmembran	2,31
5	Adaptive Immunantwort	2,27
6	Immunglobuline	1,92
7	Leukotrien-Biosynthese	1,83
8	Endozytose	1,69
9	Virus-Abwehr	1,66
10	DNA-Replikation	1,58
Vergleich 5: Mφ1 vs M1pTW		
1	Glykoproteine	2,830
2	Insulinantwort	2,36
3	Chemotaxis	1,83
4	Fibronektin	1,56
5	Zytokine	1,53
6	Immunität	1,34
Vergleich 6: Mφ1 vs M1pTW MW-Patienten		
1	Cadherine	5,14
2	Glykoproteine	4,27
3	Metall-Bindung	3,49
4	Membran	2,64
5	Procadherine	1,12
6	PH Domäne	1,81
7	Laminine	1,59
8	Ionentransport	1,57
9	Catarakt / Grauer Star	1,53
10	Prolin-reiche Motive	1,52
11	Synapsen	1,50
12	Clorid-Transport	1,37

Vergleich 7: Mφ2 vs M2pTW Kontrollen		
1	Inferferon Signaling	2,11
2	Cytoskelett	1,70
3	Chaperone	1,66
4	Aktin-Bindung	1,58
5	Kardiomyopathie	1,56
6	Immunität	1,53
7	Metall-Bindung	1,52
8	Transkription	1,51
9	Zell-Zell-Adhäsion	1,47
10	DNA-Bindung	1,37
Vergleich 8: Mφ2 vs M2pTW MW-Patienten		
1	Metallothionin	3,71
2	Interferon Signaling	3,49
3	DNA-Transkription	2,74
4	DNA-Bindung	1,52
5	Blutgerinnung	1,32

Veröffentlichungen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

L. Trotta*, K. Weigt*, K. Schinnerling, A. Geelhaar-Karsch, G. Oelkers, F. Biagi, G.R. Corazza, K. Allers, T. Schneider, U. Erben, V. Moos. „Peripheral T-Cell Reactivity to Heat Shock Protein 70 and Its Cofactor GrpE from *Tropheryma whipplei* is Reduced in Patients with Classical Whipple's Disease.“ *Infect Immun.*, 85(8), 2017.

* geteilte Erstautorenschaft

K. Weigt, A. Wiessner, A. Moter, F. Fenollar, D. Raoult, K. Allers, T. Schneider, V. Moos. „Whipple's Disease: Diagnostic Value of rpoB Gene PCR from Peripheral Blood Mononuclear Cells.“ *Mol Diagn Ther.*, 22(4):459-469, 2018.

Vorarbeiten und Teile dieser Arbeit wurden als Poster auf folgenden Kongressen präsentiert:

46. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Hamburg, 2016.

K. Weigt, L. Neumann, V. Moos, T. Schneider. „Immune modulation and host factors in *T. whipplei* infection“

Gastro-Retreat des Immuco-Graduiertenkollegs in Potsdam, 2016.

V. Moos, K. Weigt, A. Moter, A. Wießner, T. Schneider. „Update of diagnosis of Whipple's disease“

Jährlicher Kongress der European Society of Cardiology (ESC) in London, 2015.

J. Friebel, V. Moos, K. Weigt, D. Steffens, U. Landmesser, T. Schneider. „Blood culture-negative infective endocarditis due to *Tropheryma whipplei* – biomarker suggest intestinal barrier dysfunction and systemic immune activation“

44. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Bonn, 2014.

K. Weigt, V. Moos, T. Schneider. „Reduction of HLA-DR and CCL-18 expression in macrophages as hints for an active immune modulation by *Tropheryma whipplei*“

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Kathleen Sara Weigt, dass die vorliegende Dissertation zum Thema „Defizienzen in der Interaktion von Makrophagen und T-Lymphozyten bei der Entstehung des Morbus Whipple“ selbstständig verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Berlin, den

.....

Kathleen Sara Weigt